

UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSREGULATION

DER SCHILDDRÜSE

am in vitro Modell aus

Schweine-Schilddrüsen-Follikel

Hinweise auf Wachstumshehmung durch TSH

RENATE DEMHARTER

1987

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSREGULATION
DER SCHILDDRÜSE
am in vitro Modell aus
Schweine-Schilddrüsen-Follikel

Hinweise auf Wachstumshemmung durch TSH

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
RENATE DEMHARTER
aus Gersthofen

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. K. Horn

Mitberichterstatter : Prof. Dr. E. Buchborn
Prof. Dr. P. Schwandt

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter : Dr. R. Gärtner und Dr. W. Greil

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 14.05.1987

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Involvement of cyclic AMP, iodide and metabolites of arachidonic acid in regulation of cell proliferation of isolated porcine thyroid follicles

Gärtner R., Greil W., Demharter R., Horn K. (1985)
Mol. Cell. Endocrinol. 42, 145-155

Insulin and epidermal growth factor are growth factors for isolated porcine thyroid follicles

Gärtner R., Greil W., Demharter R., Horn K. (1985)
Acta Endocrinol. 108, Suppl. 267, 86

Thyrotropin is not a growth factor for porcine thyroid cells in vitro

Greil W., Gärtner R., Demharter R., Horn K. (1985)
Acta Endocrinol. 108, Suppl. 267, 85



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0047

Meine Frau, die ich liebe, hat mir die Gelegenheit
gegeben, die ich für die Herausforderung in der
Bibliothek und der Verwaltung der Bibliothek.

Meine Frau, die ich liebe, hat mir die Gelegenheit
gegeben, die ich für die Herausforderung in der
Bibliothek und der Verwaltung der Bibliothek.

Gewidmet meiner Familie

Meine Frau, die ich liebe, hat mir die Gelegenheit
gegeben, die ich für die Herausforderung in der
Bibliothek und der Verwaltung der Bibliothek.

Meine Frau, die ich liebe, hat mir die Gelegenheit
gegeben, die ich für die Herausforderung in der
Bibliothek und der Verwaltung der Bibliothek.

Meine Frau, die ich liebe, hat mir die Gelegenheit
gegeben, die ich für die Herausforderung in der
Bibliothek und der Verwaltung der Bibliothek.

Herrn Prof.Dr.med.K.Horn danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die Unterstützung in anregenden Diskussionen und konstruktiven Kritiken.

Herrn Dr.med.R.Gärtner und Herrn Dr.med.W.Greil gilt mein Dank für die Einführung in wissenschaftliches Denken und selbständiges Arbeiten, für die vorbildliche Betreuung meiner Arbeit im Labor, sowie für die freundliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation.

Frl.Dr.D.Stübner und Herrn G.Bechtner sage ich für ihre stets bereitwillige Unterstützung herzlichen Dank.

Frau P.Rank und Frau R.Buric danke ich herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meinen Dank auch an Fr.Dr.Lemmen und Herrn Dr.Strasser, die meine Arbeit durch Bereitstellung von Zell- bzw. Testmaterial förderten.

Frau F.Haag vielen Dank für die Anfertigung der Photographien.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
Zielsetzung	5
2 Materialien und Methoden	7
2.1 Substanzen, Reagenzien und Geräte	7
2.1.1 Spezielle Materialien	9
2.1.2 Kulturmedien und Supplemente	11
2.1.3 Lösen der Testsubstanzen	13
2.1.4 Geräte	16
2.2 Methodik	17
2.2.1 Isolierung von Zellen für in vitro Kulturen	17
2.2.1.1 Präparation von Schilddrüsen-Follikeln	
2.2.1.2 Präparation von Thyreozyten mit parafollikulären Zellen	20
2.2.1.3 Präparation von reinen Thyreozyten	21
2.2.1.4 Splitten humaner Fibroblasten	22
2.2.2 Aufbau eines Wachstumsassays	24
2.2.2.1 Anlegen der Kulturen	25
2.2.2.2 Startzeitpunkt	27
2.2.2.3 Inkubationsdauer und -bedingungen	28
2.2.2.4 Zell-Lyse und Bestimmung der ^3H -Inkorporation	29

2.3	Vitalitätsnachweis mit Acridinorange/ Ethidiumbromid	31
2.4	Funktionelle Untersuchungen: Jodaufnahme und -einbau in Follikel und Thyreozyten	32
2.5	cAMP-Bestimmung intra- und extrazellulär	34
2.6	DNA-Bestimmung	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Morphologie der Zellkulturen	37
3.2	Jodaufnahme und -einbau in Follikel und Thyreozyten	44
3.3	Beeinflussende Faktoren des ^3H -Thymidineinbaus	46
3.3.1	Einfluß der Matrix	46
	3.3.1.1 Vergleich des Matrixeinflusses auf Follikel und Thyreozyten	48
3.3.2	Einfluß der Medien	50
3.3.3	Einfluß durch extrazelluläres Kalzium	50

3.4	Spezifische Stimulation des ^3H -Thymidineinbaus	53
3.4.1	Stimulation mit fetalem Kalbsserum	53
3.4.1.1	DNA-Synthese-Stimulation in Mischkulturen	55
3.4.2	DNA-Synthese auf Insulin	56
3.4.3	Wachstumsstimulation mit EGF	58
3.5	Regulation des Zellwachstums	60
3.5.1	Das cAMP-System	60
3.5.2	Die Rolle des Jod in der Wachstums- steuerung	77
3.5.3	Wachstumssteuerung durch Arachidonsäure- Metaboliten	82
4	Diskussion	87
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BW 755 C	Lipoxygenase-Hemmstoff: 3-amino-1(m(trifluoromethyl)-2-pyrazolon
dBcAMP	dibutyryl-cyclo-3'-5'-Adenosinmonophosphat
DDA	2'-5'-dideoxy-Adenosin
EGF	epidermal-growth-factor
3 Faktoren	3-Faktoren-Supplement zum Kulturmedium: Hydrocortison (10nM) Somatostatin (10ng/ml) Transferrin (5ug/ml)
4 Faktoren	4-Faktoren-Supplement: 3 Faktoren plus Insulin (10ug/ml)
FKS	fetales Kalbsserum
HamsF12	von Ham entwickeltes Medium
IBMX	3-isobutyl-1-methyl-xanthin
IGF I	insulin-like growth-factor I (= Somatomedin C)
MEM	minimal essential medium
NDGA	Lipoxygenase-Hemmstoff: nor-dihydro-guararetic-acid
PI-Cyclus	Phosphatidyl-Inositol-Cyclus
PTU	Propylthiouracil

1 EINLEITUNG

Der Nachweis von Jodid als Bestandteil der Schilddrüse durch Baumann 1894 führte zum ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Schilddrüsen-Funktion und Jodgehalt der Drüse. Tierexperimente wiesen auf die Abhängigkeit des Schilddrüsen-Wachstums vom Jodgehalt der Ernährung (Bray 1968) hin. Heute gilt der Jodmangel als gesicherte Ursache der endemischen Struma. So ist Jodsubstitution als primäre Maßnahme in der Strumaprävention anerkannt (Scriba et al. 1986).

Der Pathomechanismus des Wachstums unter Jodmangel wird nach der heutigen Lehrmeinung anhand des hypothalamisch/hypophysären Regelkreises der Schilddrüse erklärt, wie von Studer in "Siegenthaler, Klinische Pathophysiologie" formuliert:

"Die euthyreote Struma ist das morphologische Substrat einer erhöhten TSH-Sekretion, die zur Erhaltung einer normalen Blut-Hormon-Konzentration in Gegenwart einer Kropfnoxe notwendig ist oder zu einer früheren Zeit notwendig war."

Neben Steuerung der Hormonsynthese wird dem TSH also auch die Stimulation des Wachstums zugeschrieben, so Studer in o.g. Lehrbuch weiter:

"TSH führt zu einer Volumenvermehrung der Schilddrüse, weil die Zahl und das Volumen jeder Follikelzelle und auch die Zahl der Follikel zunehmen."

In letzter Zeit kamen jedoch Zweifel an diesem aus Tierexperimenten etablierten Pathomechanismus auf. Die in definierten Zellkultursystemen gewonnenen in-vitro-Ergebnisse, die eine Wachstumsstimulation durch TSH belegen sollten, waren widersprüchlich: Während Nitsch (1980), Valente (1983a) und Dumont (1984) einen stimulierenden Effekt von TSH auf das Thyreozytenwachstum beschrieben, fanden Westermarck (1979), Eggo (1984) und Errick (1986) das Gegenteil, nämlich eine Wachstumshemmung durch TSH.

Diese konträren Ergebnisse wurden in unterschiedlichen Kulturansätzen gewonnen:

- Nitsch wählte Ratten-Thyreozyten in intakten Follikeln
- Valente untersuchte in Langzeitkulturen den TSH-Einfluß auf das Wachstum von speziellen Ratten-Thyreozyten-Zelllinien (FRT-Zellen: "functional rat thyroid"). Diese Zell-Linie wurde jedoch speziell durch die Abhängigkeit des Wachstums von TSH selektiert, die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert.
- Dumont untersuchte isolierte Thyreozyten von Hunden
- Westermarck kultivierte humane Thyreozyten in Suspension
- Eggo testete Schaf-Thyreozyten, die aus Follikel und -Segmenten zu Monolayern ausgewachsen waren
- Errick arbeitete mit humanen Thyreozyten in Monolayer-Kulturen

Ferner fällt auf, daß der Bedarf an Matrix für das Zellwachstum der Schilddrüse unterschiedlich eingeschätzt wurde. So legten Chiovato (1983) und Karlsson (1982) bei der Kultur von Schweine-Follikel durch Coaten der Kulturschalen Wert darauf, daß sich keine anhaftenden Monolayer-Kulturen bildeten, sondern die Follikel-Struktur in Suspension erhalten blieb. Im Gegensatz dazu hielt Eggo (1984) das Anhaften der aus dem Follikelverband ausgewachsenen Thyreozyten an eine Matrix für notwendig, um Wachstum untersuchen zu können.

Zusätzlich wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von Zellwachstum von diesen Autoren verwendet (Zählen der Zellen, Bestimmung der Gesamt-DNA oder ^3H -Thymidin-Einbau). Zum einen wurde Wachstum als Zunahme der Zellzahl definiert, andererseits ist schon vor der Zellteilung die Neusynthese von DNA festzustellen. So bot sich auch die Bestimmung der Gesamt-DNA als direktes Maß für "Wachstum der Zellen" an, ebenso der "Labelindex", d.h. Auszählen der Zellkerne, die radioaktive Stoffe aufnehmen und bei der DNA-Synthese einbauen, also in der Synthese-Phase sind. Der "Metaphasen-Index" erfaßt die Zellen, die kurz vor der Zellteilung stehen. Als technisch einfache Methode zur DNA-Synthese-Messung hat sich die ^3H -Thymidin-Inkorporation erwiesen. Die eingebaute ^3H -Thymidinmenge ist sowohl der Menge an synthetisierter DNA (Chiovato 1983), als auch der Zunahme der Zellzahl proportional (Nitsch 1980, Westermarck 1979). Gesamt-DNA- und Zellzahl-Bestimmung lassen jedoch nur begrenzte Vergleichbarkeit zu.

Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren, wie EGF und Insulin, für das Wachstum von Schilddrüsen-Zellen konnte durch in vitro Untersuchungen von Dumont (1984) und Errick (1986) belegt werden.

Neben der Untersuchung extrazellulärer Wachstumsfaktoren wurde auch über intrazelluläre Wachstums-Mediatoren spekuliert: So vermutete Westermarck (1979) als auslösenden Pathomechanismus der Jodmangel-Struma ein Zusammenspiel von Jodmangel und gestörter intrazellulärer Weitergabe von Wachstumsinformation.

Da die nach gängiger Vorstellung zur Strumaentstehung zentrale Rolle des TSH und des Jodids in vitro noch nicht gesichert werden konnte, bleiben die Fragen offen: Ist TSH ein Wachstumsfaktor? Welche Rolle spielt das Jod im Schilddrüsenwachstum?

ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Zellkulturen das Schilddrüsen-Wachstum *in vitro* zu untersuchen. Dabei sollte das Modell möglichst physiologisch sein. Daher wurde auf die Erhaltung der *in vivo* Follikel-Struktur (right-side-right Follikel mit erhaltener Polarität) geachtet, und dieses Modell mit Einzelzell-Kulturen im Monolayer verglichen.

Es sollte der Einfluß von spezifischen Wachstumsfaktoren, wie EGF und Insulin, sowie von fetalem Kalbsserum, das sich aus einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren zusammensetzt, untersucht werden. Ebenso sollte der Einfluß von Kalzium auf das *in vitro* Zellwachstum getestet werden.

Die Rolle des TSH bei der Wachstumsregulation sollte geklärt werden. Da TSH durch Bindung an den spezifischen Rezeptor die membranständige Adenylatcyclase aktiviert, wurde auch der Einfluß des cAMP auf das Thyreozyten-Wachstum untersucht. Unter Umgehung des Rezeptors wurde die Adenylatcyclase direkt stimuliert bzw. gehemmt.

Der seit langem beobachtete Zusammenhang zwischen Jodgehalt und Schilddrüsen-Wachstum sollte experimentell dokumentiert und analysiert werden.

Durch die Klärung der Beeinflußbarkeit des Wachstums durch TSH und/oder durch Jod an unserem *in vitro* Modell wären eventuell neue Aspekte zur Frage der Behandlung euthyreoter Jodmangel-Strumen mit Schilddrüsen-Hormonen oder Jodid zu gewinnen.

Ferner sollte getestet werden, inwieweit Metaboliten des Arachidonsäure-Stoffwechsels an der Zellproliferation der Schilddrüse beteiligt sind. In verschiedenen Zellsystemen wurden nämlich Arachidonsäure-Metaboliten als Mediatoren des Wachstums diskutiert (DeRubertis 1984, Hansson 1984, Boeyneams 1981, Roger 1984). Durch pharmakologische Beeinflussung der Enzyme Lipoxxygenase und Cyclooxygenase sollte die Arachidonsäure-Metabolisierung gesteuert werden. Dabei wird die Prostaglandin- und Leukotrien-Synthese so modifiziert (nach Samuelsson 1982), daß möglicherweise eine Beteiligung der Prostaglandine und Leukotriene an der Wachstumsregulation der Schilddrüse abgeschätzt werden könnte.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Substanzen, Reagenzien und Geräte

Becton+Dickinson, Heidelberg:

Radioimmunoassay für zyklisches
Adenosinmonophosphat (cAMP-RIA-Kit)

P.L.Biochemicals, St.Goar:

2'-5'-Dideoxyadenosin (DDA)

Boehringer, Mannheim:

Minimal Essential Medium Eagle (MEM),
Kollagenase (Clostridium histolyticum),
Streptomycin, Penicillin, Amphotericin B,
Transferrin,
Kalbsthymus DNA

Burroughs & Wellcome, England:

BW 755 C (3-amino-1(m(trifluoromethyl)-2-
pyrazolin)

Calbiochem/Hoechst, Frankfurt/Main:

Forskolin

Gibco Europe, Karlsruhe:

Fetales Kalbsserum (FKS)

Merck, Darmstadt:

Agarose A, Proteinase K,
 Trichloressigsäure (TCA),
 Kaliumjodid,
 Natriumdodecylsulfat (SDS),
 Trypsin-EDTA,
 Reagenzien für PBS (phosphate buffered saline)
 Reagenzien für TEN-Puffer (Tris-EDTA-NaCl)

NEN-Chemicals, Dreieich:

(Methyl-³H)-Thymidin (20Ci/mMol),
 Biofluor (Szintillationslösung für Beta-Messung)

Novo, Mainz:

Insulin Novo Actrapid^R
 (Altinsulin, Schwein, 25 U/mg)

Sandoz, Basel:

Somatostatin

Sigma-Chemicals, St.Louis/Taufkirchen:

Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen,
 bovines TSH,
 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX),
 Desoxyribonuclease I (DNase I),
 Hydrocortison,
 Epidermal-growth-factor (EGF),
 Nordihydroguarareticacid (NDGA),
 Indometazin,
 Acridinorange, Ethidiumbromid,
 dibutyryl-cyclo-AMP (dBcAMP),
 Choleratoxin

2.1.1 Spezielle Materialien

Abbot, Irland:

Venenkatheter Abbocath-T20G

Bender & Hobein, München:

Polyallomer Reagenzröhrchen (Centrifuge-Tubes)

Beckman, Pasteur-Pipetten Brand

Costar-Tecnomara, Fernwald:

Kulturschalen in einer Arbeitsplatte

(24-well-plates) hydrophil

Franz Eckert+Cie AG, Waldkirch/Breisgau:

Nybolt Filtergaze $\varnothing$ 200 μ m

Flow Laboratories GmbH, Bonn:

Kleine Petrischalen (tissue culture petriplate,
30x10 mm) hydrophil

Heraeus, Hanau:

"Petriperm"-Kulturschalen hydrophob

Schott, Mainz:

Schliffgläser mit Normalschliff-Stopfen
(16x100mm, Duran)

Serva, Heidelberg:

Silikonlösung

Vorbehandlung der Materialien für die Zellpräparation

Alle zur Präparation von Zellen benötigten Gefäße wurden stets frisch silikonisiert verwendet, um Anhaften von Zellen bzw. isolierten Follikeln zu vermeiden.

Bei der Reinigung wiederverwendbaren Materials, wie Pasteurpipetten und Reagenzgläser, wurde wegen eventueller Zelltoxizität auf die Verwendung von Detergenzien verzichtet. Stattdessen wurde es mit Alkohol gereinigt, der gründlich mit Aqua dest. abgespült wurde.

Um eine Schädigung der präparierten Follikel an den scharfkantigen Pasteur-Pipetten zu verhindern, wurden die Pasteur-Pipetten abgeflammt und nach unterschiedlichen Innendurchmessern (1500, 1000, 800 und 600 μm) sortiert.

Ein Teil der Gruppen mit über 1000 μm Spitzen-Durchmesser wurde nach dem Reinigen, Trocknen und Silikonisieren am Ende mit Pipetten-Stopfwatte als Luftfilter versehen und sterilisiert.

Agarose-Coaten der "Costar-Platten"

Die Kulturgefäße (Mulden) der "Costarplatten" werden mit 1%iger Agarose A-Lösung benetzt ("gecoatet"), um das Anhaften der Zellen zu verhindern.

Pro 24-Mulden-Platte werden in einem Schliffglas 300mg Agarose A in 30ml NaCl (0,9%ig) im kochenden Wasserbad in 10 Minuten gelöst. Hierbei ist zu beachten, daß der Spiegel der Lösung vorher markiert wird, um den Verlust durch Verdunstung ausgleichen zu können, und damit eine Konzentrierung der Agarose zu vermeiden.

Nach dem Lösen der Agarose wird das Schliffglas verschlossen, der Glaspfropfen mit Heftpflaster gesichert und das Ganze bei 100°C ca. 1 Stunde im Wärmeschrank sterilisiert.

Anschließend wird das Schliffglas in ein ca. 50°C warmes Wasserbad gestellt, um die Agarose flüssig zu halten.

Mit der flüssigen Agarose werden nun die Mulden der "Costarplatte" benetzt, indem jede Mulde einzeln mit je ca. 0,5ml Agarose A-Lösung gefüllt und sofort wieder in eine Petrischale entleert wird.

Die Kulturen werden dann nach Abkühlen der Agarose-Schicht angelegt.

2.1.2 Kulturmedien und Supplemente

MEM mit Earles Salzen bzw. HamsF12-Medium:

Eine Flasche Pulvermedium MEM (entsprechend 9,78g) bzw. HamsF12 wird zusammen mit 1g Glucose und 100mg Trypsin-Inhibitor in ca. 800ml Aqua dest. (steril) unter Rühren aufgelöst. Nach vollständiger Lösung werden 2,2g NaHCO_3 als Puffer zugegeben. Die pH-Änderung wird durch den Indikator Phenolrot sichtbar: die ursprünglich gelb-orange Lösung schlägt in kirschrot um.

Nun füllt man das Medium auf 1 Liter Gesamt-Volumen mit Aqua dest. auf.

Dann werden die Antibiotika zugegeben: Pro Liter Medium 10000 U Penicillin und 100mg Streptomycin, zusätzlich 2ml Amphotericin B (0,5 µg/ml). Für diese Antibiotika-Zusätze wurden zuvor Penicillin/Streptomycin bzw. Amphotericin B in Aqua dest. (steril) gelöst, so daß die gewünschte Dosis in je 1ml enthalten war. Diese Lösungen, steril portioniert zu je 1ml, waren bei -21°C gelagert.

Das Medium wird bis zum Versuchsbeginn bei 4°C aufbewahrt. Dann wird es auf die Versuchstemperatur von 37°C erwärmt und unter Kontrolle mit dem pH-Meter durch CO₂-Begasung ein pH von 7,35 eingestellt. Während der weiteren Versuchsvorbereitung wird der pH durch Carbo-ge-n-Begasung konstantgehalten.

Die Medien werden zu jeder Zellpräparation frisch bereitet. Ein Medium wird so nicht länger als eine Woche verwendet.

Zu jedem Versuchsprogramm wird nur die jeweils benötigte Menge Medium auf Versuchstemperatur gebracht und im pH korrigiert.

Supplemente zu den Medien:"3-Faktoren-Medium"

Zum MEM bzw. HamsF12-Medium gaben wir noch folgende

Faktoren :	Hydrocortison	10 nM
	Transferrin	5 µg/ml
	Somatostatin	10 ng/ml

Diese Faktoren werden mit dem Mediumwechsel dem Medium zugesetzt, mit diesem gefiltert (durch einen Einmalfilterhalter "Rotring" ø 0,2µm) zur "Sterilisation" und auf die Kulturen verteilt.

Für 4 "Costar 24-well-Platten" werden 96ml Medium benötigt. Wir bereiten 100ml MEM (inclusive Verlust im Filter) mit 100µl Hydrocortison 10µM (Verdünnungsfaktor 1:1000), 16µl Transferrin 31 µg/ml (Verd. 1:6250) und 1µg Somatostatin .

2.1.3 Lösen der Testsubstanzen

Alle Gefäße zur Aufbewahrung der zu testenden Substanzen waren silikonisiert.

Die Stocklösung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF wird mit 10 µg/ml MEM angesetzt. Diese wird 1:100 verdünnt zu einer 0,1 µg EGF pro ml enthaltenden Lösung, von der 5 µl auf 1 ml Kulturansatz 0,5 ng/ml EGF-Endkonzentration ergeben.

Eine 1:10 Verdünnung der 10 µg/ml Stocklösung ermöglicht bei 5 µl, 10 µl oder 50 µl auf 1 ml Testansatz Endkonzentrationen mit 5, 10 oder 50 ng EGF pro ml Medium.

Das bovine TSH beziehen wir lyophilisiert in Ampullen zu 10 U, die in 5 ml MEM steril rekonstituiert werden. Diese Stocklösung (2 U/ml) wird zu je 500 µl in sterile, silikonisierte Eppendorfgefäße portioniert und bei -20°C eingefroren aufbewahrt.

Ein Teil dieser Stocklösungen wird dann in sterilem MEM weiterverdünnt: Die neue Stocklösung enthält 100 mU TSH pro ml und wird ebenfalls bei -20°C gelagert.

Erst kurz vor Versuchsbeginn wird die 100 mU/ml Stocklösung aufgetaut. Durch Weiterpipettieren von je 100 µl Lösung wird 1:10 verdünnt und es entsteht eine Verdünnungsreihe mit 100 mU/ml (Stocklösung), 10 mU/ml, 1 mU/ml, 0,1 mU/ml bis 0,1 µU/ml TSH-Gehalt.

Das fetale Kalbsserum FKS (3,9% Gesamt-Protein, davon 2,1% Albumin) wird in Flaschen mit je 100 ml geliefert, zu je 2 ml bzw. 1 ml steril portioniert und bei -20°C eingefroren.

Zum Medium wird das FKS den benötigten Volumen-Prozent entsprechend zugegeben.

Das lyophilisierte Forskolin (ein Diterpen) ist in MEM nicht direkt löslich. Wir testeten DMSO als Lösungsmittel, doch erwies sich diese Substanz selbst als wachstumsstimulierend (siehe auch Rubin 1983a+b). Deshalb lösen wir Forskolin in absolutem Äthanol, das sich in der Endverdünnung (0,01 bis 0,00125%) im Versuchsansatz als wachstumsneutral erwies.

1mg Forskolin (MW 410,5) auf 60µl Äthanol ergibt eine 40mM Stocklösung. Diese 1:10 in MEM weiterverdünnt ergibt 4mM Forskolin, davon 10µl pro 1ml Versuchsansatz (1:100) ergibt 40µM Forskolin-Endkonzentration.

Wird die 4mM Lösung 1:10 weiterverdünnt, erhalten wir eine 400µM Stocklösung. Von dieser erfolgen durch Zugabe zum Versuchsansatz weitere Verdünnungsschritte:

50µl auf 1ml Ansatz (1:20) ergibt 20µM,
13µl auf 1ml (1:80) ergibt 5µM Forskolin.

Das lyophilisierte Choleratoxin (2mg pro Ampulle) wird zunächst in 1ml Aqua dest. steril gelöst.

Die Weiterverdünnung erfolgt in MEM, und zwar 1:100 und 1:10, d.h. Stocklösungen mit 20 µg/ml bzw. 2 µg/ml entstehen.

Davon werden pro Versuchsansatz (1000µl) 5µl zugegeben, so daß Endkonzentrationen von 100 bzw. 10 ng/ml erreicht werden.

Vom 2'-5'-Dideoxyadenosin (DDA, MW 235,2) werden 0,9408mg in 1ml MEM gelöst, was eine 4mM Stocklösung ergibt.

5µl dieser Stocklösung auf 1000µl Versuchsansatz (1:200) ergibt 20µM, 10µl auf 1000µl ergibt 40 µM Endkonzentration.

Das Dibutyryl-cycloAMP (dBcAMP, MW 490) wird ebenfalls direkt in MEM gelöst: 0,98mg pro ml Medium ergeben eine 2mM Stocklösung, von der 5µl auf 1ml Kulturansatz 10µM, 20µl auf 1ml 40µM dBcAMP bedeutet.

Zur Herstellung von 5mM Isobutylmethylxanthin (IBMX -) Stocklösung, d.h. Lösen von 11,12mg IBMX in 10ml MEM, ist Erwärmung auf 40°C und ständiges Rühren auf dem Magnetrührer für 1-2 Stunden nötig.

Propylthiouracil (PTU, MW 170,2) wird zunächst in Äthanol (absolut) gelöst, dann mit MEM weiterverdünnt: 1,7mg PTU in 200µl Äthanol und 9,8ml MEM ergeben eine 1mM Stocklösung, die bei Zugabe zu den Kulturen 1:100 verdünnt wird.

Indometazin löst sich unter Rühren und Erwärmen 1mM in MEM.

Von dieser Stocklösung 10µl auf 1ml Kulturansatz ergibt 10µM Indometazin bzw. nach 1:10-Vorverdünnung 1µM Indometazin.

Den "Lipoxygenase-Hemmer" BW755C erhielten wir 500mM Stocklösungen in Äthanol¹.

Diese BW755C-Stocklösung wird 1:50 bzw. 1:500 in MEM vorverdünnt, um durch Zugabe von 10µl auf 1ml Endvolumen (1:100) Endkonzentrationen von 10 bzw. 100µM zu erhalten.

¹BW755C wurde freundlicherweise von Herrn Dr.Strasser, Med.Klinik Innenstadt, zur Verfügung gestellt.

Der zweite "Lipoxygenase-Hemmer" NDGA (MW 302,4) war lyophilisiert. Wir rekonstituieren 15,12mg in 100 μ l Äthanol (absolut) und erhalten so eine 500mM Stocklösung.

Diese NDGA-Lösung wird 1:33 in MEM zu einer 15mM-Lösung verdünnt, von dieser 10 μ l auf 1ml Versuchsvolumen ergibt 150 μ M NDGA.

2.1.4 Geräte

Diaphot TMD-Mikroskop von Nikon (Vergrößerung: 40x, 100x, 200x und 400x) mit Phasenkontrasteinrichtung und Quarzlampe für Fluoreszenz

Photometer von Zeiss

Brutschrank von NAPCO Portland Oregon (USA), CO₂-reguliert

Laminar-Air-Flow von CEAG Verfahrenstechnik, Selm-Bork

2.2 Methodik

2.2.1 Isolierung von Zellen für in vitro Kulturen

2.2.1.1 Präparation von Schweine-Schilddrüsen-Follikel

Prinzip: Das Ziel der Präparation ist es, Follikel aus parafollikulärem Gewebe und Drüsenbestandteilen zu lösen, ohne die Struktur der Funktionseinheit "Follikel" zu zerstören. Zu diesem Zweck hat sich folgende Methode bewährt (nach Gärtner 1985a und Greil 1984 b):

(Abb. 1)

In die Gefäße der freipräparierten Schilddrüse wird Kollagenase infundiert, dadurch das parafollikuläre Gewebe verdaut, was zur Freisetzung der Follikel aus dem Schilddrüsen-Gewebe führt.

Praktische Durchführung:

Im Schlachthof holten wir die Schilddrüsen von 6-8 Monate alten, 60-80 kg schweren frischgeschlachteten Schweinen: Unter Mitnahme der Halsgefäße werden die Drüsen mit Metzgermessern von der Trachea gelöst, das Präparat dann cranial und caudal der Schilddrüse, in sicherem Abstand von der Schilddrüsen-Kapsel, abgetrennt.

Zum Transport werden die Drüsen mit Eis gekühlt, wobei Alufolie zwischen Eis und Drüse diese vor Tauwasser (hypotonisch!) schützt.

Ca. 30 Minuten nach Entnahme werden im Labor bei Raumtemperatur die aus den Halsgefäßen abgehenden Schilddrüsen-Gefäße präpariert:

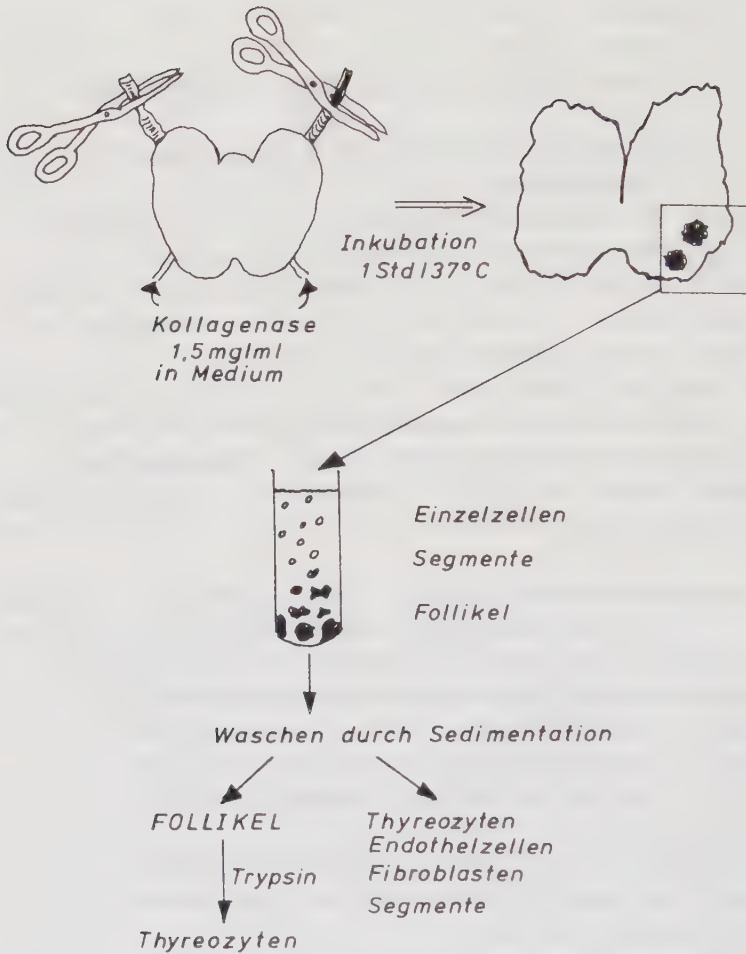


Abb. 1: Präparation von Schilddrüsen-Follikel, Thyreozyten mit und ohne parafollikulären Zellen

Von dorsal werden am unteren Schilddrüsenpol die Arterien bzw. Venen dargestellt, wobei man umgebendes Gewebe grob entfernt, und ein Katheter (Abbocath) wird eingeführt.

Über den fixierten Katheter wird nun langsam 37°C warmes MEM vorgespritzt.

Aus der Drüse führende Gefäße werden so sichtbar und abgeklemmt.

Dann werden bis zu 5ml Kollagenase (1,5 mg/ml, in MEM gelöst und auf 37°C erwärmt) langsam infundiert, wobei sich die Drüse unter geringem Widerstand ausdehnt.

Für etwa 60 Minuten wird die vollständige Drüse bei 37°C in MEM inkubiert.

Danach wird die Bindegewebskapsel und das Fettgewebe entfernt, aus dem lysierten Bindegewebe lassen sich die Follikel mit warmem Medium auswaschen.

Die Follikel-Suspension wird in Polyallomer-Röhrchen (hydrophob) gesammelt.

Nun schließen sich Waschvorgänge an:

Die Follikel werden durch vorsichtiges Spülen mit der Pasteur-Pipette resuspendiert und können dann 2,5 Minuten sedimentieren. Der Überstand wird nach diesen 2,5 Minuten verworfen.

Nach Resuspension des Sediments in ca. 5 ml frischem MEM und Abfangen von größeren Aggregaten mit der Pasteur-Pipette erfolgt erneute Sedimentation und Verwerfen des Überstandes.

Diesem 1. Waschvorgang folgt ein 2. analog.

Die so isolierten Follikel werden auf diese Weise 6mal unter sterilen Bedingungen gewaschen.

Bis zur Stimulation wird je 100µl Follikel-Sediment in MEM (4,9ml mit 1% FKS) in Petripermschalen im Brutschrank (5% CO₂-Begasung, 37°C, H₂O-gesättigte Atmosphäre) inkubiert.

2.2.1.2 Präparation von Thyreozyten mit parafollikulären Zellen

Prinzip: Bei der unter 2.2.1.1 beschriebenen Präparation von Follikeln werden z.T. Follikel mechanisch eröffnet, so daß Segmente und einzelne Thyreozyten frei werden. Da die Follikel in 2,5 Minuten sedimentieren, können aus dem Überstand durch Zentrifugation Thyreozyten und parafollikuläre Zellen gewonnen werden. (Abb.1)

Praktische Durchführung:

Die Präparation der Schilddrüse wird wie für Follikel unter 2.2.1.1 beschrieben begonnen. Nach Vereinigen und Sedimentieren der aus der verdauten Schilddrüse ausgewaschenen Follikel wird jetzt der Überstand weiter bearbeitet:

Grobe Kollagenreste werden aus dem Überstand mit Nylon-Filter ($\varnothing$ 200 μ m) abgefiltert. Durch Zentrifugation (45 Sekunden bei 75g) werden die noch verbliebenen größeren Segmente entfernt.

Aus dem Überstand dieser Zentrifugation gewinnt man durch erneutes Zentrifugieren (10 Minuten bei 700 Upm in der Sarstedt-Thrombofuge) ein lockeres Pellet von Einzelzellen, vorwiegend Thyreozyten, aber auch Fibroblasten und Endothelzellen.

Es schließen sich wieder unsterile und sterile Waschvorgänge an: Dazu wird das Pellet von Einzelzellen zunächst in frischem, unsterilem MEM suspendiert, gröbere Aggregate werden mit der Pasteur-Pipette eingefangen und verworfen. Die verbleibenden Zellen werden bei 700 Upm in 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen.

Im sterilen Arbeitsbereich werden die Zellen in sterilem MEM erneut suspendiert. Nach Verschließen der Zentrifugationsröhrchen mit steriler Alufolie folgt wiederum Zentrifugation. Dieser sterile Waschvorgang wird mindestens 3mal durchgeführt.

Danach werden die Zellen in MEM mit 1% FKS suspendiert, aus einem Aliquot wird in der Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration ermittelt.

Die Zellsuspension wird auf eine Konzentration von 50000 Zellen pro ml mit MEM verdünnt.

Je 1ml, also 50000 Zellen, gibt man dann in eine Mulde der "Costarplatte" zur Kultur im Brutschrank (Bedingungen, wie für Follikel) bis zum Versuchsbeginn.

2.2.1.3 Präparation von reinen Thyreozyten

Prinzip: Thyreozyten und parafollikuläre Zellen besitzen annähernd gleiche Größe und sind somit durch oben beschriebene Sedimentations- und Zentrifugationsverfahren nicht zu trennen. Deshalb trennen wir zunächst durch Sedimentation die parafollikulären Fibroblasten und Endothelzellen ($\varnothing$ 5-20 μ m) von den Follikeln ($\varnothing$ 100-200 μ m), aus denen anschließend durch Trypsinieren reine Thyreozyten gewonnen werden (Abb.1).

Praktische Durchführung:

Die nach der unter 2.2.1.1 beschriebenen Methode präparierten Follikel werden zur Vorbereitung der Trypsinierung in MEM ohne Trypsin-Inhibitor gewaschen. Das Sediment wird in 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung suspendiert. In 37°C warmem Wasser wird die Suspension bis zu 15 Minuten inkubiert und dabei mit der Pasteur-Pipette ($\varnothing$ >1000 μ m) behutsam durchmischt. Ab der 10. Minute werden alle 1,5 bis 2 Minuten Proben entnommen, um den Fortschritt der Trypsinverdauung zu beobachten.

Sind nur noch Zellverbände von 3-5 Zellen zu sehen, spätestens jedoch nach 15 Minuten, wird die Trypsin-Inkubation abgebrochen, um Zellmembranschäden zu verhindern. Die Zellsuspension wird hierzu 75 Sekunden bei 75g zentrifugiert, wobei nicht-trypsinierte, größere Zellverbände sedimentieren und im Überstand die Einzelzellen verbleiben.

Die Einzelzellen werden anschließend bei 700 Upm in der Sarstedt-Thrombofuge in 10 Minuten abzentrifugiert.

Die Thyreozyten werden nun in MEM mit Trypsin-Inhibitor gewaschen, d.h. suspendiert und nochmals zentrifugiert, um die Trypsinaktivität vollständig zu unterbinden.

Die so gewonnenen Thyreozyten werden in MEM mit 1% FKS aufgenommen, auf eine Zellkonzentration von 50000 Zellen/ml eingestellt, in die Mulden der "Costarplatten" verteilt und vorinkubiert, wie unter 2.2.1.2 beschrieben.

2.2.1.4 Splitten humaner Fibroblasten

Prinzip:

Die Fibroblasten² stammten aus der Vorhaut eines 4 Wochen alten, gesunden Säuglings, wurden nach der sog. "Deckglas"-Methode präpariert, sie befanden sich im 4. Transfer und bildeten einen dichten Monolayer in einer 100ml-Gewebekulturflasche. Nach Splitten mit Trypsin werden hiervon je 100000 Zellen pro Kulturansatz verteilt.

²Für Versuchsansätze mit Fibroblasten wurden uns humane Fibroblasten-Kulturen freundlicherweise von Fr.Dr.Lemmen aus der Med.Poliklinik (Vorstand: Prof.Dr. Zöllner) zur Verfügung gestellt.

Praktische Durchführung:

Nach Abnehmen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 20ml warmem (37°C), sterilem PBS³ gewaschen, um das FKS des Kulturmediums auszuwaschen. Jetzt wurden 20ml 0,25%iges Trypsin-EDTA auf den Zellrasen gegeben und ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur unter behutsamem Schwenken der Kulturflasche inkubiert. Mikroskopisch sieht man hierbei, wie sich die ursprünglich spindelförmigen, fischzug-artig formierten Fibroblasten wie Häutchen vom Gefäßboden ablösen, sich allmählich abrunden und frei in der Trypsin-EDTA-Lösung treiben.

Nach Überführen in zwei 50ml Plastikröhrchen wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von je 10ml Medium mit Trypsin-Inhibitor (100mg pro Liter Medium) gehemmt. Bei 600 Upm in der Sarstedt-Thrombofuge wurden die Fibroblasten in 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Medium gewaschen, um Trypsin vollständig zu entfernen.

Die Fibroblasten wurden in MEM mit 1% FKS aufgenommen, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und zu je 100000 Zellen pro Kulturgefäß auf die Mulden der "Costarplatte" verteilt.

³PBS: phosphate buffered saline

NaCl 150mM, NaH₂PO₄ 50mM (pH 7,4)

2.2.2 Aufbau eines Wachstumsassays

Um Wachstum vergleichen zu können, bestimmen wir das Ausmaß der DNA-Neusynthese, indem wir den ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel- bzw. Monolayerkulturen messen: Dazu werden von dem präparierten Zellmaterial Kulturen angelegt, diesen ^3H -Thymidin, ein Nucleotid, angeboten, das dann von den Zellen proportional zum stimulierten Wachstum bei der DNA-Synthese eingebaut wird (nach Westermarck 1979).

Um die stimulatorische Wirkung einzelner Substanzen in verschiedenen Zell-Kulturen vergleichen und reproduzieren zu können, wird das Protokoll der Versuchsbedingungen vorher festgelegt, d.h.

- 1) gleiche Zellzahl in den Parallelansätzen
- 2) definierter Startzeitpunkt
- 3) festgelegte Inkubationszeit, in der die Testsubstanzen den ^3H -Einbau beeinflussen können
- 4) Lyse der Zellen und Bestimmung des eingebauten ^3H -Thymidin

Diese Protokollpunkte wurden in mehreren Vorversuchen variiert, um eine Zusammenstellung möglichst optimaler Rahmenbedingungen für die Inkubation zu finden.

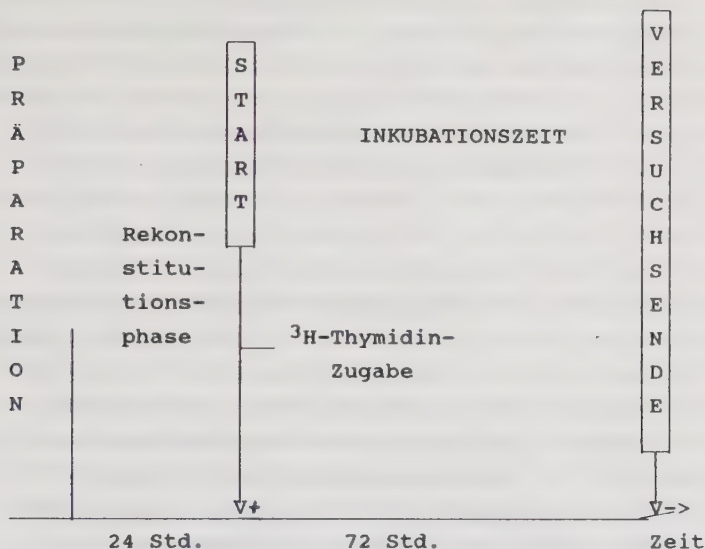


Abb.2: Schema zur Inkorporation von ^3H -Thymidin

2.2.2.1 Anlegen der Kulturen

Follikel: Die Präparation der Follikel umfaßt einen halben Arbeitstag. Nach Präparation und Kultur in MEM mit 1% fetalem Kalbsserum für 24 Stunden werden für die Versuche Subkulturen angelegt. Die Follikel werden hierzu mit dem Medium aus den Petripermschalen genommen, vereinigt und nach dem Sedimentationsverfahren zweimal gewaschen.

Nach Zugabe von frischem MEM oder HamsF12-Medium mit oder ohne 1% FKS werden die Follikel erneut suspendiert. Je 1 ml dieser möglichst homogenen Suspension wird in eine Mulde der "Costarplatte" gegeben.

Bestimmung der Zellzahl in Follikeln

Die Ermittlung der Zellzahl, in Einzelzell-Suspensionen bereitet mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer keine Schwierigkeiten. Problematischer ist es, die Anzahl der Zellen in Follikel-Verbänden festzustellen, um gleiche Zellzahl, wie in Einzelzell-Kulturen, vorlegen zu können.

Auszählungen unter dem Lichtmikroskop ergaben eine Follikeldichte von ca. 50 Follikel pro Kultur. Dabei waren 0,2ml des ursprünglich präparierten Follikel-Sedimentes auf 2 "Costarplatten" zu je 24 Mulden verteilt worden. Daraus folgt, daß in 0,2ml Follikel-Sediment ca. 2400 Follikel enthalten waren.

Zur Feststellung der Thyreozyten-Zahl pro Follikel wurden zweimal 0,2ml Follikel-Sediment nach der Präparationsmethode für reine Thyreozyten (siehe 2.2.1.3) trypsiniert. Aus diesen ca. 2400 Follikeln waren 7,45 Mio. bzw. 6,5 Mio. Thyreozyten zu isolieren.

Pro Follikel ist somit eine Zellzahl von ca. 1400 Thyreozyten anzunehmen.

Eine Kultur mit 50 Follikeln dürfte also 70000 Thyreozyten enthalten.

Thyreozyten mit und ohne parafollikulären Zellen werden bereits am Tage der Präparation zu je 50000 Zellen auf die Versuchs-Subkulturen verteilt (siehe unter 2.2.1.2 und 2.2.1.3). Von diesen bereits fest am Gefäßboden haftenden Kulturen wird nach 24 Stunden das Medium vorsichtig abgenommen und erneuert.

Fibroblasten sind zu je 100000 Zellen auf die Versuchskulturen verteilt und erhalten ebenfalls frisches, wiederum serumhaltiges Medium.

Wir legen deshalb als Ausgangsmaterial pro 1ml Medium vor:

50 Follikel (entspr. 70000 Thyreozyten) oder

50000 Thyreozyten mit oder ohne
parafollikuläre Zellen oder

100000 Fibroblasten .

Zu diesen Zelldichten kamen wir aus der Überlegung, daß:

- genügend Zellmaterial pro Kultur am Ende zur Einbaubestimmung zur Verfügung stehen sollte, und diese Ausbeute durch zu geringe Zellzahl erschwert würde, andererseits aber:
- zu hohe Zellzahlen zum Versuchsstart zu vorzeitiger Wachstumsbeendigung führen könnte, wenn, wie für nicht-maligne Zellen bekannt, Kontakthemmung konfluenter Monolayer vorliegt.

Mikroskopische Beobachtung der Kulturen ließ die verwendeten Zelldichten geeignet erscheinen.

2.2.2.2 Startzeitpunkt

Nach einer Rekonstitutionsphase von 24 Stunden werden die Follikel aus der Primärkultur (in Petripermschalen) genommen und auf die Kulturansätze in den Mulden der "Costarplatten" verteilt.

Einzelzellen erhalten 24 Stunden nach dem Verteilungsvorgang frisches Medium. Sie haben sich am Gefäßboden abgesetzt und mit Ausbildung eines festhaftenden Monolayers begonnen.

Damit sind die Wachstumsvoraussetzungen für Follikel und Einzelzellen vergleichbar: es liegen zum Versuchsstart morphologisch intakte, differenzierte Zellen vor.

Jeder Ansatz enthält 1ml Medium, dazu werden je 10 μ l des zu untersuchenden Agens in 100-facher Endkonzentration und 20 μ l des ^3H -Thymidin-Tracers (vorverdünnt, so daß 20 μ l auf 1ml = 0,7 μ Ci pro Versuchsansatz) gegeben.

Der Ansatz wird unter sterilen Bedingungen (steriler Arbeitsplatz "laminar-airflow") durchgeführt, das Medium mit den Faktoren oder FKS werden durch den Einmalfilter sterilisiert.

Alle Agenzien wurden in 100-facher Konzentration steril angesetzt, damit bei Zugabe von je 10 μ l Lösung auf 1000 μ l Medium die erwünschte Endkonzentration erreicht wird.

In mikroskopischen Kontrollen (400-fache Vergrößerung) des Versuchsmediums nach Inkubation ergab sich kein Hinweis auf Ausfallen eines Agens.

Alle Versuchsansätze wurden als Doppelwerte durchgeführt und sind mindestens 1-mal reproduziert.

2.2.2.3 Inkubations-Zeitraum und -Bedingungen
Vorversuche ergaben bereits nach 8 Stunden erste unterscheidbare Differenzen der Einbauraten von ^3H -Thymidin auf unterschiedliche Stimulation. Diese zeigten sich nach 8-tägiger Inkubation noch deutlicher. Doch wiesen zunehmende Zellnekrosen darauf hin, daß im in-vitro-System ohne Mediumwechsel die Nährstoffe verbraucht waren.

Inkubationsbedingung:

Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen für Zellkulturen.

Die Inkubationszeit wurde auf 72 Stunden festgelegt.

2.2.2.4 Zell-Lyse und Bestimmung der ^3H -Thymidin-Inkorporation

Als Maß für das Wachstum soll uns die Einbaurate an ^3H -Thymidin während der oben genannten Inkubationsdauer dienen. Um nun den Einbau an ^3H -Thymidin für alle Kulturen gleichzeitig zu beenden, nehmen wir das Medium mit dem ^3H -Thymidin ab, waschen noch freies extrazelluläres ^3H mit frischem Medium aus, Fällern mit TCA und lysieren die Zellen.

Die Zell-Lyse, sowie die anschließende Verdauung der DNA zur homogenen Suspension erfolgt noch im Kulturgefäß, um eventuelle Fehler durch unvollständige Herausnahme der Zellen zu verringern.

Die homogene DNA-Suspension läßt sich gut mit der Szintillations-Lösung vermischen, womit beste Voraussetzungen für die exakte ^3H -Bestimmung in repräsentativen Aliquots bestehen.

Vorgehen: Zell-Lyse

Nach Abnehmen des Waschmediums wird auf jeden Monolayer 1ml 10%ige TCA (4°C) gegeben. Bei 4°C wird 10 Minuten inkubiert, wobei hochmolekulare DNA ausfällt. Nach Abpipettieren der TCA wird die gefällte DNA mit Phosphatpuffer (PBS) vorsichtig gewaschen.

Dann werden Proteinreste über 24 Stunden bei Raumtemperatur in geschlossenen Gefäßen lysiert: Ein Gemisch aus 100µl Proteinase K (Endkonz.: 0,2mg Proteinase in 500µl Gemisch), 50µl SDS (Natriumdodecylsulfat 1%) und 350µl TEN⁴-Puffer wird zugegeben.

⁴TEN: Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 100mM

Die hohe Viskosität der nun freigesetzten hochmolekularen DNA erschwert die Entnahme äquimolarer Aliquots. Deshalb verdauen wir die DNA durch Zugabe von 50ul DNAase I (Endkonz.: 20 U DNase in 550µl DNA-Suspension). Nach weiteren 24 Stunden sind Aliquots für die Bestimmung der ^3H -Inkorporation zu entnehmen.

Bestimmung der ^3H -Thymidin-Inkorporation

Zur Vorbereitung der Zählung im Betacounter wird zu je 100ul Zell-Lysat 1ml Szintillations-Lösung ("Biofluor", 4°C) gegeben.

Die Emulsion wird gut gemischt, nochmals auf 4°C nachgekühlt, und im Betacounter 2 Minuten gezählt.

ÜBERBLICK ÜBER DIE ZELL-LYSE:

- Medium absaugen
- Zellen waschen mit Medium
- TCA-Fällung (ca.20min / $+4^\circ\text{C}$)
- TCA absaugen
- Pellet waschen mit PBS
- Lyse der Zellen: (24 Std./Raumtemp.)
 - Proteinase K
 - SDS 1%ig
 - Tris-EDTA-Puffer
- DNA-Verdauung mit DNAase I (24 Std./Raumtemp.)
- Bestimmung des ^3H -Einbaus

2.3 Vitalitätsnachweis mit Acridinorange/Ethidiumbromid

Lebende Zellen fluoreszieren durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA grün, während tote Zellen durch Acridinorange rot gefärbt werden.

Zur Herstellung von Acridinorange-Stocklösung werden 2mg Acridinorange in 20ml PBS gelöst, dann 1:10 mit PBS verdünnt. Ethidiumbromid-Stocklösung erhält man, indem man 4mg Ethidiumbromid in 20 ml PBS löst.

Die Stocklösungen werden jeweils bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Als Arbeitslösung werden die Stocklösungen 1:1 vermischt und dann 1:10 in Medium weiterverdünnt.

50µl dieser Arbeitslösung werden mit 50µl Zellsuspension vermischt und im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet:

Bei Vitalfärbung von mehreren Präparationen waren in den Follikelverbänden nur vereinzelt tote Thyreozyten zu finden (ca. 90-95% vitale Zellen).

Von den Thyreozyten mit und ohne parafollikulären Zellen erwiesen sich 97% im Fluoreszenzmikroskop als vital.

Unter den gesplitteten Fibroblasten waren jedoch nur 70 bis 80% der Zellen vital.

2.4 Funktionelle Untersuchungen:

Jod-Aufnahme und -Einbau in Follikel und reine Thyreozyten

Um nachzuweisen, daß die für die Schilddrüse typische Jodaufnahme und -verwertung auf TSH-Stimulation in unserem "Schilddrüsen-Modell" erhalten bleibt, werden sowohl Follikel, als auch reine Thyreozyten in ^{125}J -haltigem Medium für 30 Minuten mit und ohne TSH inkubiert.

Die relative ^{125}J -Aufnahme und -verwertung in den Zellen wird anschließend ermittelt.

Vorgehen:

Nach 24-stündiger Rekonstitution im Brutschrank wurden Follikel aus den Petriperimschalen vereinigt. Aus einem Teil der Follikel werden nach der unter 2.2.1.3. beschriebenen Methode Thyreozyten gewonnen. Sowohl Follikel als auch frisch präparierte Thyreozyten werden dann zweimal mit dem jeweils geeigneten Verfahren (s. unter 2.2.1.) steril gewaschen und auf Versuchsansätze zu je 0,02ml Follikel-Sediment (entspr. ca. 480 Follikel oder ca. 670000 Thyreozyten) bzw. 150000 Thyreozyten in MEM mit je 400µl Gesamtvolumen in Eppendorfgeläße verteilt.

Zum Versuchsstart wurde in jeden Ansatz je 100µl MEM-Lösung mit 1µM KJ und 200000cpm ^{125}J mit und ohne TSH (1mU/ml) zupipettiert. Die Zellsuspension wurde dann von Hand geschüttelt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Follikel bzw. Zellen in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, 480µl des Überstandes abgenommen und das Pellet mit kaltem Medium gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Abnahme des gesamten Überstandes unter Sicht, wurde der ^{125}J -Gehalt des Pellets, d.h. der Zellen, mittels Gammacounter bestimmt.

Die Jodidaufnahme wird in Prozent der eingesetzten Gesamt-Radioaktivität berechnet.

Nun wurde aus den Pellets mit Trichloressigsäure (TCA) das organifizierte ^{125}J gefällt, die Radioaktivität des TCA-Pellets gemessen.

Der prozentuale Anteil der Counts im TCA-Pellet an der Anzahl der Counts im 1. Pellet entspricht dem eingebauten Jodid-Anteil.

Da markiertes und unmarkiertes Jodid gleichermaßen von Thyreozyten aufgenommen und verwertet wird, werden bei Aufnahme von z.B. 1% der 200000cpm ^{125}J auch 1% des $1\mu\text{M}$ Jodids aufgenommen.

Dadurch läßt sich relative Jodidaufnahme und -einbaurrate (%) in Absolutwerte (pMol Jodid) umrechnen:

Jodidgehalt des Mediums: $1\mu\text{M}$ oder 500 pMol pro 500ul

Absolute Jodidaufnahme:

$$\text{pMol J}^- = \frac{\text{Jodidaufnahme (\%)}}{100} \times 500 \text{ pMol Jodid}$$

absoluter Jodeinbau:

$$\text{pMol J}^- = \frac{\text{Jodideinbau (\%)}}{100} \times \text{absolute Jodid-aufnahme (pMol)}$$

2.5 cAMP- Bestimmung intra- und extrazellulär

a) Bestimmung des intrazellulären cAMP

Die Follikel werden am ersten Tag nach Präparation in MEM mit 3 Faktoren und 0,5mM IBMX suspendiert. Von dieser Suspension werden je 480µl in silikonisierte Eppendorfgefäße überführt und bei 37°C inkubiert. Die Stimulation wird mit und ohne TSH (1 mU/ml) durchgeführt, die Beeinflussung der Adenylatcyclase erfolgt mit DDA (5/20 und 40 µM) 10 Minuten lang oder mit Forskolin (0,25/0,5 µM) 30 Minuten lang. Die Inkubation wird nach Zentrifugieren (30sec., 10000g) durch Zugabe von 500µl 6%iger TCA (eiskalt) gestoppt. Die Zellextrakte werden 3x mit wassergesättigtem Äther ausgeschüttelt, der Äther wird unter Stickstoffatmosphäre verdampft (bei 65°C) und der Rückstand in Wasser gelöst. Darin wird cAMP radioimmunologisch (cAMP-Kit, Becton + Dickinson) bestimmt.

b) Bestimmung des extrazellulären cAMP

Nach dem Versuchsprotokoll für Wachstumsassays stimulierten wir unmarkierte Follikel-Kulturen mit TSH in den Konzentrationen 0,1/10/1000 µM/ml. Nach 3-tägiger Inkubation wurde im Medium radioimmunologisch der extrazelluläre cAMP-Spiegel bestimmt.

2.6 DNA-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der DNA erfolgte mit der Diphenylamin-Methode modifiziert nach K.Burton 1956: Hierbei entsteht durch die Reaktion von Diphenylamin mit der DNA ein blauer Farbstoff, dessen Intensität bei 600nm der DNA-Konzentration direkt proportional ist. Quantifiziert wird die DNA-Konzentration durch Vergleich der Extinktion der jeweiligen Probe mit einer durch DNA-Standard-Konzentrationen erstellten Eichkurve.

Durchführung:

Der Ansatz der Farbreaktion erfolgte in Schliffgläsern mit Glasstopfen. Nach der Zell-Lyse (siehe 2.2.2.4) wurde aus jedem Kulturgefäß ein Aliquot von 200µl entnommen, mit Tris-EDTA-Puffer verdünnt und mit 200µl Perchlorsäure (1n) versetzt. Dieses Gemisch wurde geschüttelt und 15 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 800ul Diphenylamin-Reagens zugegeben. Dieses Reagens besteht aus Diphenylamin (1,5g gelöst in 100ml Essigsäure und 1,5ml konz.H₂SO₄) und aus einer Mischung mit wässrig-verdünntem Acetaldehyd (16mg/ml davon 0,1ml auf 20ml Reagens). Nach gutem Durchmischen erfolgte Inkubation der verschlossenen Glasröhrchen über Nacht bei 30°C im Wasserbad.

20 Stunden später wurde die Extinktion der Proben bei 600nm in einer Quarzküvette im Zeissphotometer gemessen.

Zunächst wurde die Extinktion der Standard-Konzentrationen an Kalbsthymus-DNA (6,25/12,5/25/50/100 und 200 µg DNA pro ml) und einer Kontrolle, bestehend aus Puffer, bestimmt, daraus die Eichkurve erstellt.

Nun wurden die Proben aus den Zellkulturen photometrisch untersucht. An der Eichkurve wurde die zur jeweiligen Extinktion gehörende DNA-Konzentration abgelesen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Morphologie der Zellkulturen

Morphologie isolierter Follikel in hydrophilen und hydrophoben Kulturschalen

Nach Präparation und mehreren Waschvorgängen zeigen sich Follikel von inhomogener Größe. Diese sind deformiert: Länglich ausgezogene, eingekerbte, teilweise offene und teilweise geschlossene Follikel.

24 Stunden später haben sich die Follikel abgerundet bzw. wieder verschlossen. Die Größen erscheinen einheitlicher. (Foto 1)

Mikroskopisch sind bei 200- bis 400-facher Vergrößerung in Suspension zwei Arten von Follikel zu erkennen: Die einen erscheinen glasig-durchscheinend, die anderen gelblich trübe.

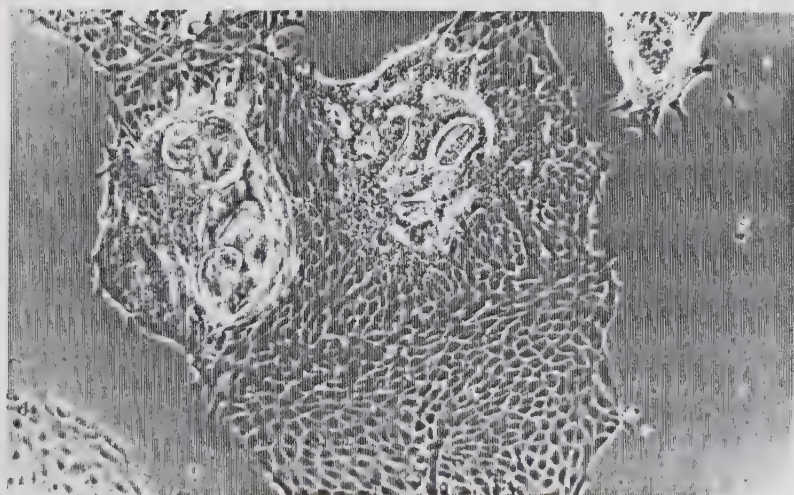
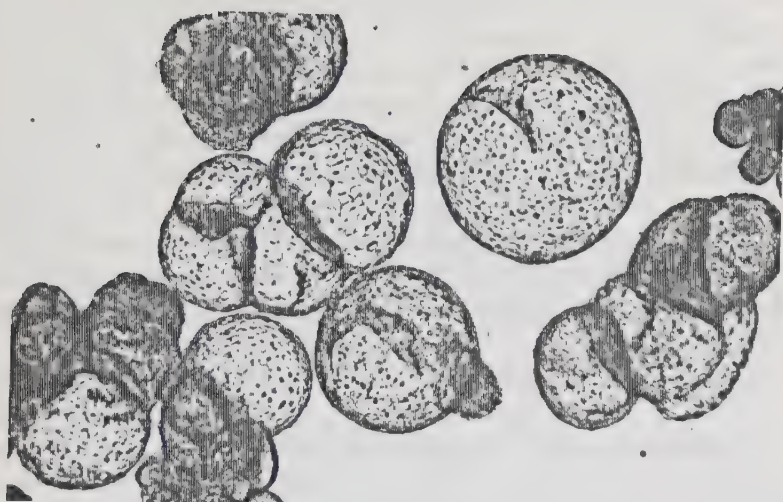
In den hydrophilen, ungecoateten Kulturschalen ("Costarplatte" mit 24 Mulden) haften die Follikel bereits nach 24 Stunden am Gefäßboden. Die ersten Zellen wandern aus dem Follikel-Verband aus, wobei der ursprüngliche Follikel zunächst als Gewölbe im Zentrum steht. (Foto 2)

Allmählich sinkt dieses Gewölbe ein, es bildet sich eine dichte Zellaggregation in der Mitte eines sich weiter ausbreitenden Zellrasens. Die im Follikelverband fast kubischen Thyreozyten werden im Zellrasen polygonal mit pseudopodien-artigen Ausläufern.

Auch nach Beendigung der Versuche (nach ca. 96-stündiger Inkubation) waren mikroskopisch keine Fibroblasten erkennbar.

Foto 1: Follikel in Suspension :
Phasenkontrastaufnahme von Follikeln in
MEM mit 1% FKS am Tage der Präparation
nach dem sterilen Waschen und Überführen
in die Petripermschale.
(200-fache Vergrößerung, Fokus etwa auf
Äquatorebene der Follikel)

Foto 2: Phasenkontrastaufnahme von aus dem
Follikelverband auswachsenden Thyreozyten
nach 3-tägiger Kultur in MEM mit 1% FKS
in Petripermschalen.
(100-fache Vergrößerung, Fokus auf Mono-
layer-Ebene, zwei Rest-Follikel stehen
noch über dieser Ebene)



In mit Agarose-Lösung gecoateten Kulturschalen bzw. in Petripermschalen schwimmen die Follikel zunächst im Medium. Nach 1 bis 3 Tagen jedoch sieht man die ersten Follikel am Boden anhaften. Dieses Anhaften wird unter TSH-Stimulation verzögert. Wiederum wandern die Zellen unter Bildung von Zellausläufern aus dem Follikel-Verband aus.

Extrazelluläres Kalzium scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen: In MEM (Ca^{2+} : 1,8mM) ist die Haftung des Zellrasens deutlich besser als in HamsF12-Medium (Ca^{2+} : 0,3mM).

Morphologie reiner Thyreozyten (Foto 3)

Die aus Follikeln isolierten Thyreozyten bilden in den Mulden der "Costarplatten" innerhalb von 24 Stunden guthaftende Zellrasen. Die im Überstand verbleibenden Zellen erweisen sich in der Vitalfärbung als tote Zellen und sind beim Mediumwechsel leicht abpipettierbar. In HamsF12-Medium mit 0,3mM Ca^{2+} -Gehalt ist das Anhaften der Zellen deutlich gegenüber dem Anhaften in MEM mit 1,8mM Ca^{2+} verzögert.

Zwischen den sich bald dicht lagernden polygonalen Thyreozyten sind mikroskopisch (100- bis 400-fache Vergrößerung) keine Fibroblasten zu erkennen.

Morphologie von Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten

Die bei der Präparation von Follikeln aus dem Waschmedium gewonnenen Einzelzellen lagern sich rasch zu Zellaggregaten zusammen. Nach dem Überführen dieser Zellgruppen in die Mulden der "Costarplatte" entstehen bereits nach 24 Stunden guthaftende Zellrasen, deren Anhaftung am Schalenboden unter $0,3\text{mM Ca}^{2+}$ geringer ist als unter 1.8mM Ca^{2+} .

Tote Zellen (laut Vitalfärbung) schwimmen im Überstand und sind damit leicht auswaschbar.

Die Zellrasen-Stücke breiten sich allmählich aus zu einem geschlossenen Monolayer, die im Überstand noch runden Thyreozyten werden durch Zellausläufer polygonal. Vereinzelt sind Fibroblasten durch ihre spindelförmige Zellform von den polygonalen Thyreozyten zu differenzieren.

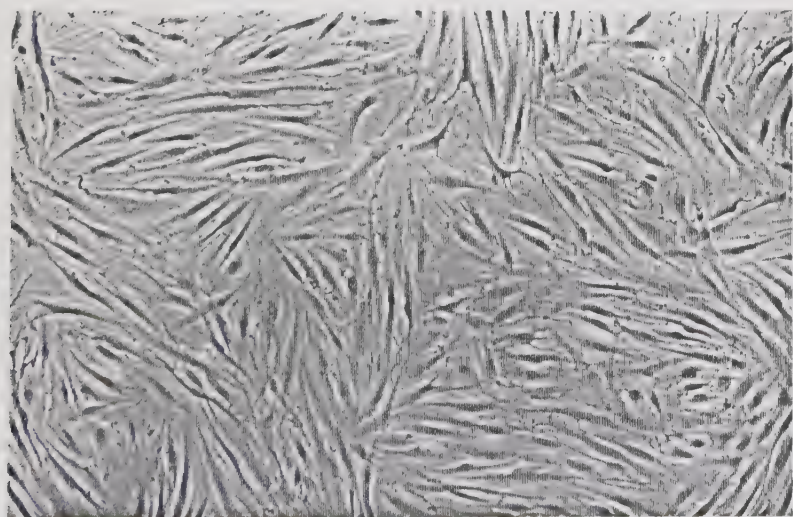
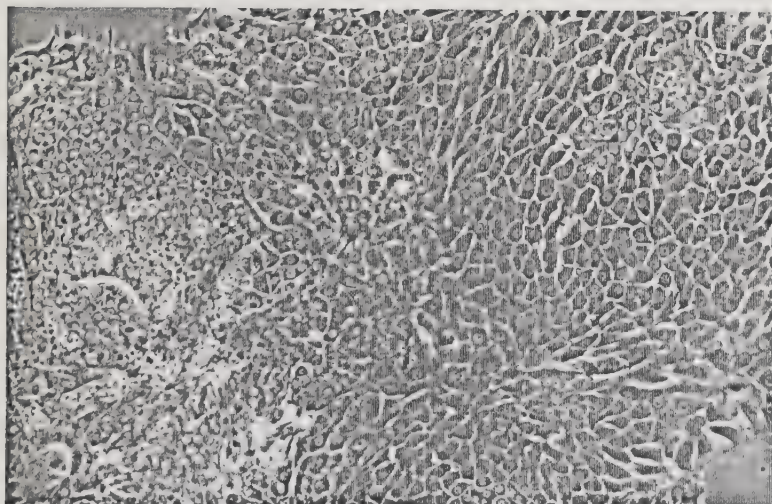
Die Morphologie der Thyreozyten in dieser Mischkultur unterscheidet sich nicht von der oben für Thyreozyten in Reinkultur beschriebenen.

Morphologie humaner Fibroblasten (Foto 4)

Nach Überführen der trypsinierten humanen Fibroblasten aus der 100ml-Kulturflasche in kleine Petrischalen schwimmen die anfänglich runden Zellen im Medium. Schon nach wenigen Stunden im Brutschrank sinken die Fibroblasten zu Boden, nun mit Pseudopodien-artigen Ausläufern und sichtbarem, spindelförmigem Kern. In mit FKS angereichertem Medium entsteht in wenigen Tagen eine fischzug-artige Formation guthaftender Fibroblasten, die bald den ganzen Gefäßboden bedeckt.

Foto 3: Thyreozyten in dichtem Monolayer:
Phasenkontrastaufnahme nach 3-tägiger
Kultur in MEM mit 1% FKS in Gewebekultur-
Schalen
(200-fache Vergrößerung)

Foto 4: Fibroblasten-Monolayer:
Phasenkontrastaufnahme nach 3-tägiger
Kultur in MEM mit 10% FKS in
Gewebekultur-Schalen
(100-fache Vergrößerung)



3.2 Jod-Aufnahme und -Einbau

(Abb. 3)

Nachdem pro Ansatz ca. 480 Follikel (entsprechend ca. 670000 Thyreozyten) mit 150000 Thyreozyten verglichen werden, wäre für Follikel etwa die 4-fache Jodidaufnahme zu erwarten.

Follikel haben ohne TSH 6% (30pMol) Jodid aufgenommen, wovon 12% (3,5pMol) organifiziert wurden. Unter TSH-Stimulation hatten die Follikel zwar einen geringeren Jodidgehalt (3% oder 15pMol), die TCA-Fällung der Follikel erbrachte aber eine deutliche Zunahme des organifizierten Jods auf 35% (5,3pMol).

Bei Thyreozyten betrug die unstimulierte Jodidaufnahme 0,3% (1,5pMol). Unter TSH-Stimulation nahmen die Thyreozyten nur 0,2% (1pMol) des markierten Jodids auf. Sowohl mit als auch ohne TSH waren die Thyreozyten fähig nur 4% (0,04pMol) des intrazellulären Jodids zu organifizieren und zu speichern.

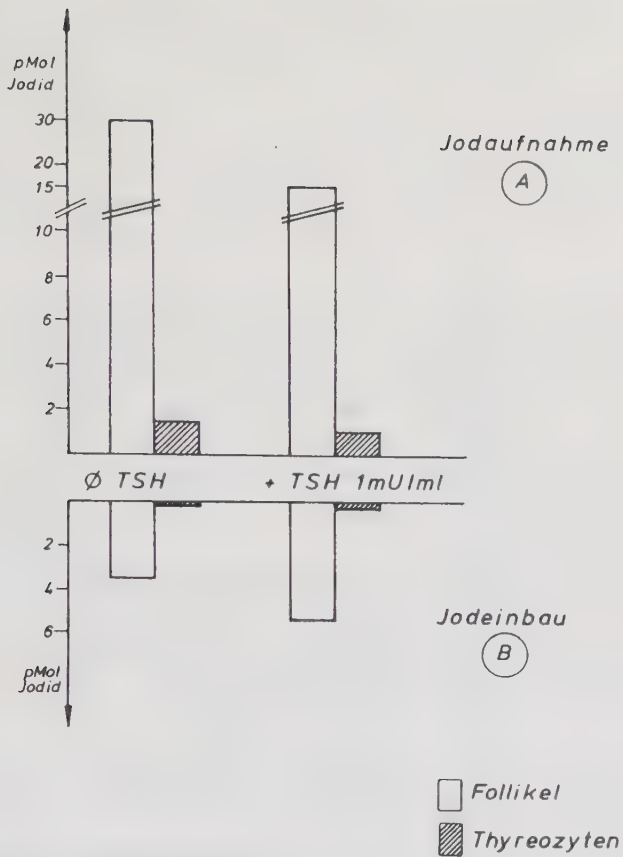


Abb. 3: Vergleich von Jodaufnahme und -einbau in Follikel und Thyreozyten

- A:** Jodaufnahme in Follikel (entsprechend 670000 Thyreozyten) und Thyreozyten (150000 Einzelzellen) bei 30min. Inkubation mit und ohne TSH (1mU/ml) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)
- B:** organifiziertes Jod nach Fällung der Zellen mit TCA

3.3 Wachstumsbeeinflussende Faktoren

Als Maß für das Zellwachstum wird die Einbaurrate an ^3H -Thymidin benützt.

Zum Wachstumsvergleich der Kulturen setzen wir den ^3H -Thymidin-Einbau in nicht stimulierte Zellen gleich 100%.

3.3.1 Einfluß der Matrix auf den ^3H -Thymidin-Einbau

Das Wachstumsverhalten von Follikel in hydrophilen, Matrix-bietenden Schalen soll mit dem in Agarose A-gelcoateten, keine-Matrix-bietenden Schalen verglichen werden:

Die Inkubationsgefäße wurden mit Agarose A (1%ig in physiologischer NaCl, steril) unter sterilen Arbeitsbedingungen benetzt.

Nach Abkühlen der Agarose-Benetzung wurden Follikelkulturen parallel in benetzten Kulturschalen, in denen die Follikel nicht anhaften, und in unbenetzten, in denen die Follikel anhaften können, inkubiert.

(Abb.4)

Der Basaleinbau an ^3H -Thymidin war in Follikel ohne Matrix geringfügig höher.

Die Stimulierbarkeit des ^3H -Thymidin-Einbau erwies sich jedoch bei Matrix besser als ohne Matrix:

Durch Insulin wurde der Einbau auf bis zu 3,5-fach stimuliert (ohne Matrix: 2-fach);

EGF (5ng/ml) steigerte den ^3H -Thymidin-Einbau auf den 20-fachen Basalwert (ohne Matrix lediglich 8-fach).

Das Anhaften von Follikel an eine Matrix verbesserte also ihre Stimulierbarkeit durch rezeptorabhängige Hormone.

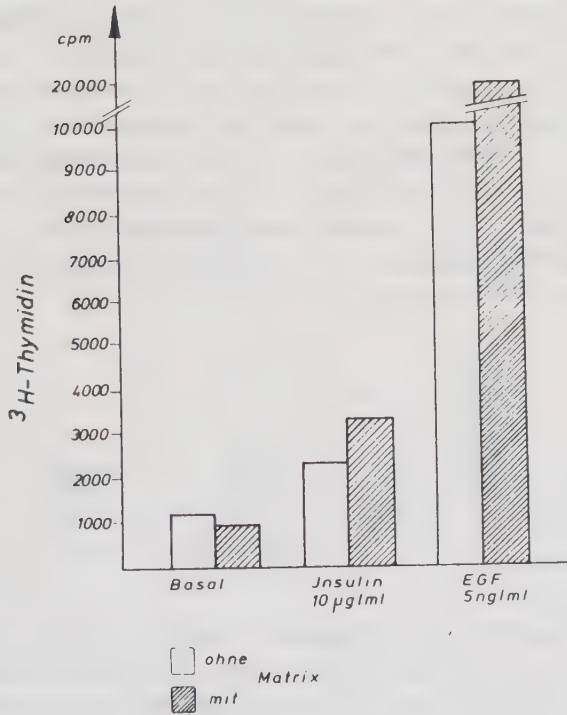


Abb. 4: Einfluß der Matrix auf den ^3H -Thymidin-Einbau in isolierte Follikel in MEM ohne FKS oder weitere Faktoren (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

3.3.1.1 Vergleich des Matrix-Einflusses auf Follikel und Thyreozyten

Der Einfluß der Matrix auf den ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel und in Thyreozyten wurde in Medium ebenfalls ohne weitere Faktoren verglichen (Abb. 5):

Rezeptorabhängige Wachstumsfaktoren, wie EGF und Insulin, stimulierten die an der Matrix anhaftenden Thyreozyten kaum noch, Follikel hingegen signifikant, während DDA und Forskolin unter Rezeptorumgehung beide Zellarten gleichermaßen im Wachstum beeinflussen.

Hier liegt aufgrund mangelhafter Stimulierbarkeit der Thyreozyten der Verdacht nahe, daß die spezifischen Rezeptoren nicht für die Agenzien zugänglich sind, hingegen an Follikeln die Rezeptoren dem faktorhaltigen Medium zugewandt bleiben.

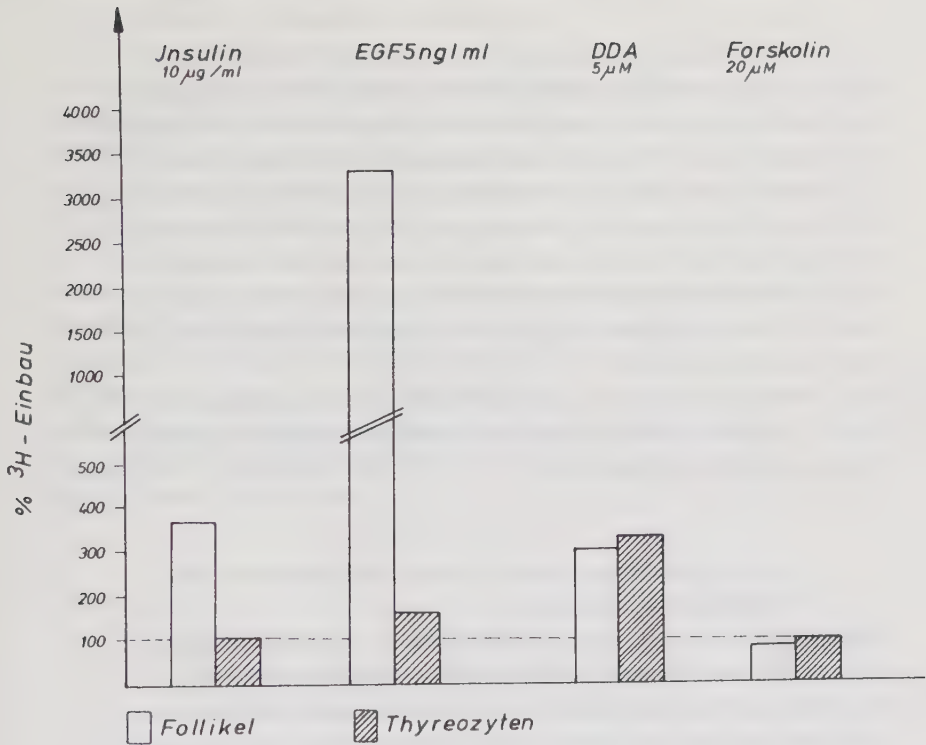


Abb. 5: Vergleich der Stimulierbarkeit von Follikel und Thyreozyten durch rezeptorabhängige und unabhängige Faktoren unter Einfluß der Matrix-Anhaftung in MEM ohne FKS mit Insulin (10 µg/ml) (100% = ^3H -Einbau in Thyreozyten unter Stimulation mit 10 µg/ml Insulin) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

3.3.2 Einfluß der Medien auf den ^3H -Thymidin-Einbau

Die verglichenen Medien MEM (mit Earle's Salzen) und HamsF12 unterscheiden sich vor allem in der Zusammensetzung der Aminosäuren und des Kalziumgehaltes. Die Herstellungs- und Anwendungsbedingungen sind identisch. An einer Zellkultur aus Thyreozyten (50000 Zellen/Schale, ohne Fibroblasten) verglichen wir das Wachstum in MEM mit dem in HamsF12-Medium. Beiden Medien wurde je ein Hormon-Supplement aus Hydrocortison (10mM), Somatostatin (10ng/ml) und Transferrin (5µg/ml) zugesetzt, ohne Zusatz von FKS.

Der ^3H -Thymidin-Einbau wurde durch Insulin (10µg/ml) stimuliert und betrug in MEM rund 94000 cpm, in HamsF12-Medium nur 54000 cpm.

3.3.3 Einfluß durch extrazelluläres Kalzium auf den ^3H -Thymidin-Einbau

Das Medium HamsF12 enthält Kalzium in 0,3mM-Konzentration, während in MEM 1,8mM Kalzium enthalten sind. Morphologische Untersuchungen ließen einen Einfluß des extrazellulären Kalziums auf die Anhaftung von Zellen erkennen.

Zur selektiven Untersuchung des Kalzium-Einflusses auf das Wachstum haben wir den Kalzium-Gehalt in HamsF12-Medium auf 1,8mM substituiert, und das Follikel- sowie das Thyreozyten-Wachstum in substituiertem und nicht-substituiertem Medium verglichen (Abb. 6):

Zunächst wurden Follikel (ca. 70000 EZ) in HamsF12-Medium ohne FKS mit 4 Faktoren inkubiert:

Bei 0,3mM Ca^{2+} betrug der insulin-stimulierte ^3H -Thymidin-Einbau rund 15000 cpm, unter 1,8mM Ca^{2+} war der Ausgangswert auf 13000 cpm erniedrigt.

Mit EGF in Konzentrationen von 5 und 10 ng/ml waren die Follikel unter beiden Kalziumkonzentrationen auf bis zu 5-fach stimulierbar.

Im Parallelversuch wurden 50000 Thyreozyten (ohne Fibroblasten) pro Kulturschale ebenfalls in HamsF12 mit niedriger und hoher Kalziumkonzentration sowie mit 4-Hormon-Supplement inkubiert (Abb. 6):

Auch bei den Thyreozyten war das Insulin- bzw. EGF-stimulierte Wachstum bei höherem Kalziumgehalt nicht signifikant gesteigert.

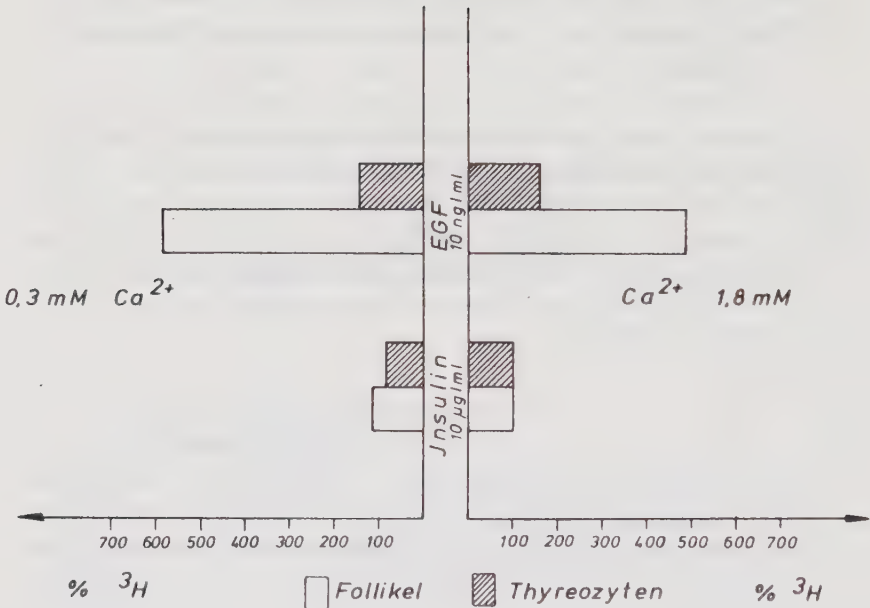


Abb. 6: Vergleich des ^3H -Thymidin-Einbaus unter niedriger und hoher Kalziumkonzentration in Follikel (ca. 70000EZ) und Thyreozyten (50000EZ)
 (100% = Einbau in jeweilige Zellart unter 10 µg/ml Insulin)
 (Mittelwerte eines Doppelansatzes, auf der Abszisse ist der prozentuale ^3H -Thymidin-Einbau dargestellt)

3.4 Spezifische Stimulation des ^3H -Thymidin-Einbaus

3.4.1 Stimulation mit fetalem Kalbsserum (FKS)

Das fetale Kalbsserum (FKS) mit 3,9% Gesamtprotein, davon 2,1% Albumin, stellt ein Gemisch aus verschiedenen Wachstumsfaktoren und -hormonen dar. Versuche, Serum durch definierte Wachstumsfaktoren bzw. Hormone zu ersetzen, sind bereits vor einigen Jahren begonnen worden (Barnes 1980). In serumfreiem Medium jedoch wurde deutlich, daß jede Zelllinie in der in vitro Kultur bestimmte Faktoren zum Wachstumsunterhalt benötigt. In etablierten Zellkulturen und -linien ist FKS der letzte undefinierte Bestandteil des Mediums (Hayashi 1987).

Die Stimulierbarkeit durch FKS ist bei unseren verschiedenen Kulturansätzen unterschiedlich ausgeprägt (Abb.7): Während Follikel (ca.70000EZ) und Fibroblasten (100000EZ) in 1%igem FKS jeweils ca.10000 cpm ^3H -Einbau zeigen, ist der ^3H -Thymidin-Einbau in reine Thyreozyten (50000EZ) mit rund 70000 cpm ^3H unter 1% FKS deutlich erhöht.

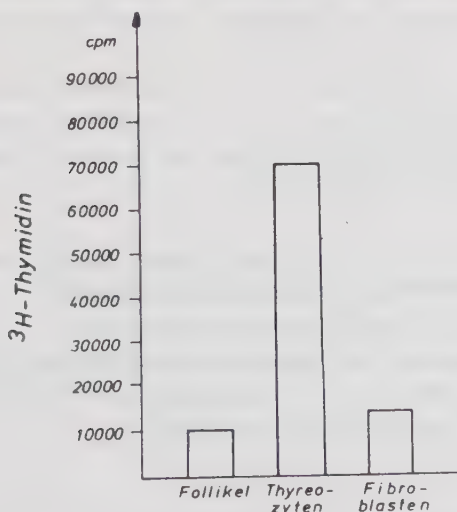


Abb. 7: Vergleich des ^3H -Thymidin-Einbaus in 72 Stunden in Follikel (ca.70000EZ), Thyreozyten (50000EZ) und humane Fibroblasten (100000EZ) mit 1% FKS ohne weitere Faktoren. (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

Der Einfluß von FKS auf das Follikel-Wachstum wurde mit FKS-Konzentrationen von 1%, 5% und 10% in MEM ohne weitere Faktoren untersucht:

Ohne FKS wurden durchschnittlich 500 cpm ^3H eingebaut (Kontrolle). Bei 1% FKS ergab sich 20-fache, bei 5% rund 140-fache und bei 10% sogar 160-fache Einbausteigerung (Abb. 8).

Es besteht somit hochsignifikanter Zusammenhang zwischen FKS-Konzentration und ^3H -Thymidin-Einbau.

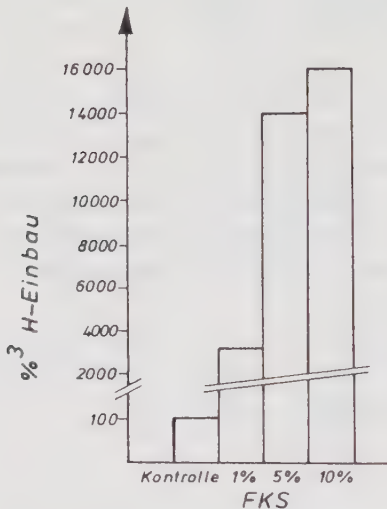


Abb. 8: ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel (ca. 70000 EZ) auf FKS-Stimulation in MEM ohne Faktoren (100% = ^3H -Thymidin-Einbau ohne Stimulation, ca. 500 cpm) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

Das Wachstum reiner Thyreozyten wurde durch FKS-Erhöhung von 1% auf 5% in MEM ohne weitere Faktoren verdoppelt. Im Gegensatz zur massiven Wachstumssteigerung (25-faches Wachstum auf 140-faches Wachstum) bei Follikeln führt die FKS-Erhöhung von 1% auf 5% bei reinen Thyreozyten also zu geringerem Wachstumsanstieg. Dies spricht für eine geringere Stimulierbarkeit der Einzelzellen oder für eine Inhibierung der Rezeptoren für die im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren.

3.4.1.1 DNA-Synthese-Stimulation in Mischkulturen aus Thyreozyten und parafollikulären Fibroblasten

Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten wurden in MEM ohne weitere Faktoren inkubiert. Hier stimulierte eine FKS-Erhöhung von 1% auf 5% den ^3H -Thymidin-Einbau auf den 9-fachen Wert.

In Mischkultur mit Fibroblasten sind Thyreozyten somit stärker stimulierbar (9-fach) als in Reinkultur (2-fach).

Mit parafollikulären Fibroblasten sind Thyreozyten in der Stimulierbarkeit den Follikeln ähnlicher (bei Follikeln Wachstumssteigerung von 25-fach auf 140-fach entspricht rund 6-facher Stimulation !).

Unter denselben Bedingungen (MEM ohne weitere Faktoren) inkubierte Fibroblasten wurden durch FKS-Erhöhung von 1% auf 4% in ihrer DNA-Synthese 2-fach gesteigert. Die Fibroblasten in Reinkultur entsprachen also den Thyreozyten in Reinkultur.

Die FKS-Zugabe von 1% auf 5% bzw. 4% bei reinen Thyreozyten und reinen Fibroblasten führt jeweils zur Verdoppelung der Synthese, die 9-fache DNA-Synthese in Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten ist aber kaum mit der Synthesesteigerung einer Zellart zu erklären. Vielmehr ist eine Interaktion der Zellarten anzunehmen, die zu gesteigerter DNA-Synthese führt.

3.4.2 DNA-Synthese auf Insulin

Insulin hat an Zellen in invitro Kulturen vermutlich einen permissiven Effekt auf anabole Faktoren (Barnes 1980). So soll es der entscheidende Kofaktor für die Stimulation des Thyreozyten-Wachstums durch TSH sein (Roger 1983), steigert aber auch selbst den ^3H -Thymidin-Einbau in Thyreozyten (Eggo 1984).

Den mitogenen Effekt des Insulins versuchen wir an Schilddrüsen-Follikel nachzuvollziehen:

In MEM mit 1% FKS und 3 weiteren Faktoren wurden die Follikel (ca. 70000EZ) mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin inkubiert. Der Gesamteinbau von ^3H -Thymidin betrug ohne Insulin-Stimulation durchschnittlich 6300 cpm, mit Insulin war er auf 15000 cpm gesteigert.

Insulin steigert hier den FKS-stimulierten ^3H -Einbau signifikant (2,4-fach).

Auch ohne FKS, doch mit den 3 weiteren Faktoren, war eine deutliche Dosisabhängigkeit des insulin-induzierten Wachstums zu erkennen:

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin verdoppelte, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin führte zu annähernd 4-fachem ^3H -Thymidin-Einbau (Abb. 9).

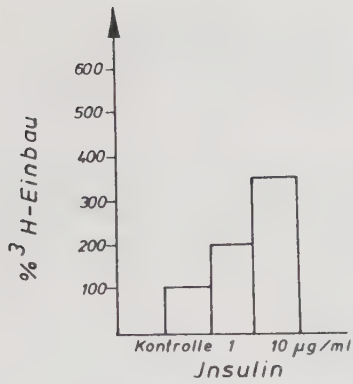


Abb 9: Einfluß von Insulin auf den ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel (ca. 70000EZ) in MEM mit 3 Faktoren (Kontrolle=Follikel nur mit 3 Fakt.)

3.4.3 Wachstumsstimulation mit EGF

Verschiedene Zelllinien, wie humane Karzinom-Zellen, Fibroblasten aus Hamster- und Hunde-Nieren sowie Sertoli-Zellen aus Mäuse-Testes waren in vitro durch den "epidermal-growth-factor" EGF im Wachstum stimulierbar (Barnes 1980).

Die Stimulierbarkeit durch EGF wurde ebenfalls unter in-vitro-Bedingungen für humane Thyreozyten (Errick 1986), für Thyreozyten und Follikel-Fragmente von Schweinen (Westermarck 1986), von Hunden (Roger 1982a) und von Schafen (Eggo 1984) nachgewiesen.

So sollten auch differenzierte, intakte Schweine-Schilddrüsen-Follikel durch EGF in ihrer DNA-Synthese stimulierbar sein.

Follikel wurden in serumfreiem MEM ohne Insulin mit 3 Faktoren inkubiert. Diesen Kulturen wurde EGF in den Konzentrationen 0,01/0,05/0,1/1 und 5 ng/ml zugegeben. Auch in Schweine-Schilddrüsen-Follikel war eine Zunahme der DNA-Synthese vorhanden:

Bei 0,1 ng/ml EGF war die ^3H -Einbaurrate auf den 10-fachen Kontrollwert (Follikel in 3F-Medium) gesteigert. Als maximale Stimulation fand sich bei 0,5 und 1 ng/ml der 20-fache Kontrollwert. Mit 5ng/ml EGF war der ^3H -Einbau nicht mehr weiter steigerbar (Abb.10).

Auch im in-vitro-Modell sprechen Follikel-Zellen also auf den epidermalen Wachstumsfaktor an.

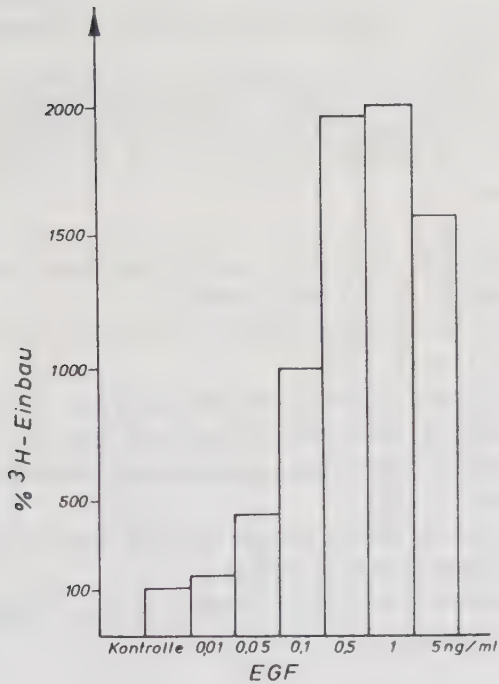


Abb.10: Stimulation des ^3H -Thymidin-Einbaus in Follikel (ca.70000EZ) durch EGF in MEM mit 3 Faktoren (Kontrolle= Follikel mit 3 Fakt.) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

3.5 Regulation des Zellwachstums von Follikelzellen

3.5.1 Das cAMP-System

TSH stimuliert durch Bindung an den membranständigen Rezeptor die Adenylatzyklase, wodurch cAMP als second messenger gebildet wird.

Hier soll nun der Effekt des cAMP-Spiegels auf das Wachstum von Follikeln, Thyreozyten, Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten und humanen Fibroblasten untersucht werden.

Dazu wird:

- a) die cAMP-Bildung über den membranständigen Rezeptor durch Stimulation mit TSH erhöht;
- b) die basale cAMP-Bildung durch DDA direkt inhibiert (nach Fain 1972);
- c) eine cAMP-Akkumulation unter Umgehung des Rezeptors durch Forskolin (nach Daly 1984) zum Teil in Verbindung mit IBMX (Phosphodiesterase-Hemmer) herbeigeführt;
- d) die cAMP-Bildung durch den bekannten cAMP-Stimulator Choleratoxin direkt erhöht;
- e) die cAMP-Wirkung durch das synthetische dibutyryl-cycloAMP nachgeahmt.

ad a) Einfluß von TSH auf ^3H -Thymidin-Einbau und cAMP-Bildung

^3H -Thymidin-Einbau auf Stimulation mit TSH

Follikel wurden in MEM mit 3 Faktoren, Insulin und 1% FKS mit TSH stimuliert. Hierbei soll nun der Zusammenhang zwischen TSH-Stimulation und DNA-Synthese-Steigerung belegt werden (Abb. 12b unten):

Die DNA-Synthese unter 1% FKS wird durch Zugabe von TSH (1/10/100/1000 und 10000 $\mu\text{U/ml}$) dosisabhängig auf bis zu 25% reduziert. Diese Hemmung durch TSH ist hochsignifikant.

Auch ohne Stimulation durch FKS in 3F-Medium wurde die ^3H -Thymidin-Einbaurrate in Follikel auf TSH-Zugabe untersucht: Hierbei hemmte TSH in den Konzentrationen 1 $\mu\text{U/ml}$ bis 100 $\mu\text{U/ml}$ den Einbau signifikant (Abb.11).

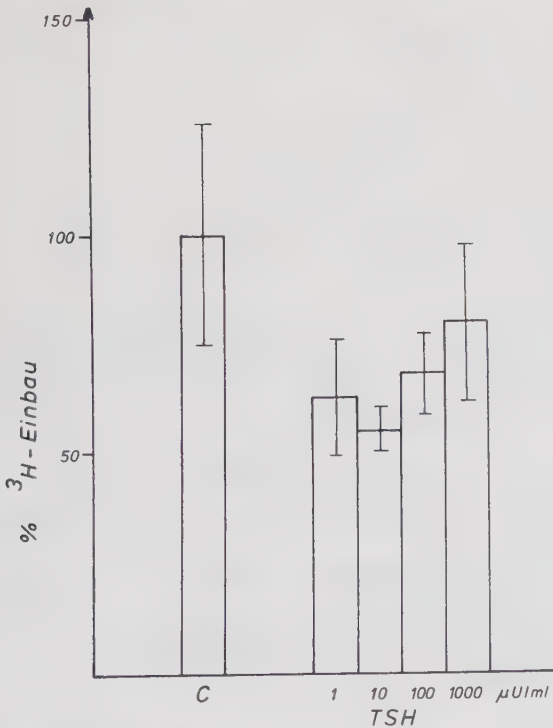


Abb.11: Effekt von TSH (1 μU -1mU/ml) auf den ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel in 3F-Medium ohne FKS (Mittelwerte und Standardabweichung dreier Doppelansätze)

Intrazellulärer cAMP-Gehalt unter TSH-Stimulation

Der basale cAMP-Gehalt betrug in Follikeln in MEM mit 3 Faktoren rund 1,5pMol pro μg DNA. Diese cAMP-Konzentration wurde durch TSH (1mU/ml) nach 10 Minuten auf etwa 16pMol cAMP pro μg DNA stimuliert (Abb. 12a):

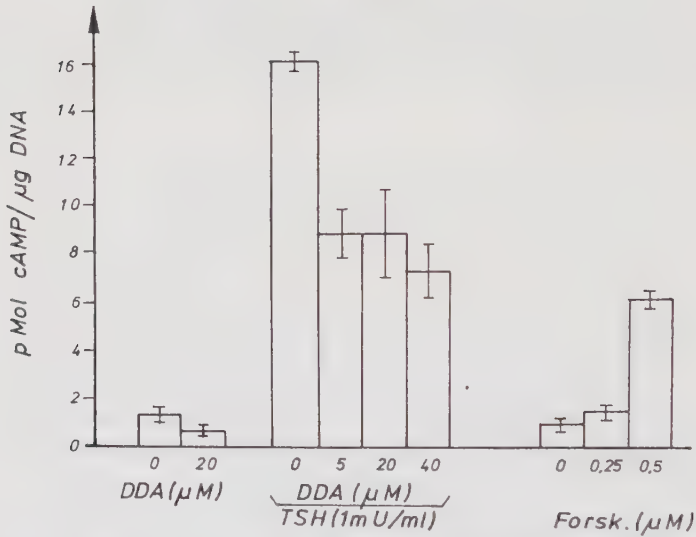


Abb.12a: Einfluß auf den intrazellulären cAMP-Spiegel durch TSH-Stimulation und DDA oder auf Forskolin unter 0,5mM IBMX in Follikel (ca.840000EZ) in MEM mit 3 Faktoren (Inkubationszeit: 10 Minuten) (Mittelwerte und Standardabweichung zweier Doppelansätze)

Vergleich der ^3H -Einbaurate und des cAMP-Spiegels

Parallel zu den mit Tracer inkubierten, mit TSH stimulierten Follikel wurden Follikel ohne ^3H -Thymidin inkubiert, zur Bestimmung des extrazellulären cAMP-Gehaltes:

Nach Ablauf der Inkubationszeit (72 Std.) läßt sich im extrazellulären Medium ein cAMP-Konzentrations-Unterschied nachweisen, der deutlich von der TSH-Stimulation abhängig ist (Abb.12b).

Während aber der extrazelluläre cAMP-Spiegel bei $10\mu\text{U/ml}$ TSH ein Maximum von rund $2,7\text{pMol}$ im Medium erreicht und bei $1000\mu\text{U/ml}$ TSH wieder ein Abfall des cAMP-Spiegels auftritt, nimmt die ^3H -Einbaurate mit zunehmender TSH-Konzentration kontinuierlich weiter ab.

Obwohl die cAMP-Bildung unter $1000\mu\text{U/ml}$ TSH also bereits deutlich geringer ist als unter $10\mu\text{U/ml}$ TSH, wird die DNA-Synthese unter $1000\mu\text{U/ml}$ TSH weiterhin supprimiert. Der erniedrigte cAMP-Spiegel bei $1000\mu\text{U}$ TSH kann bei dieser Langzeitinkubation (72 Std.) auch auf andere Effekte beruhen, z.B. vermehrter Abbau (extra- und intrazellulär).

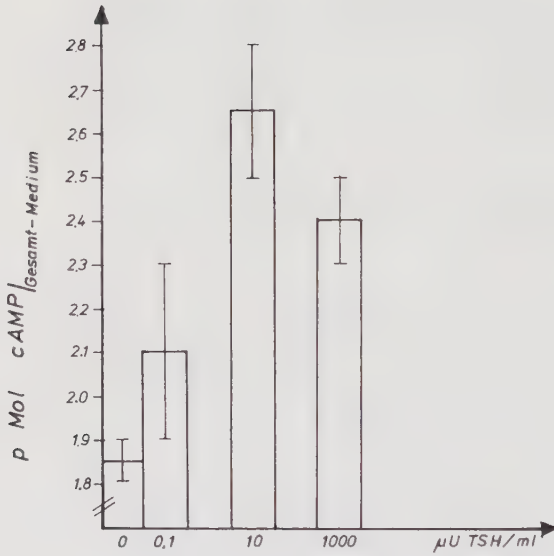
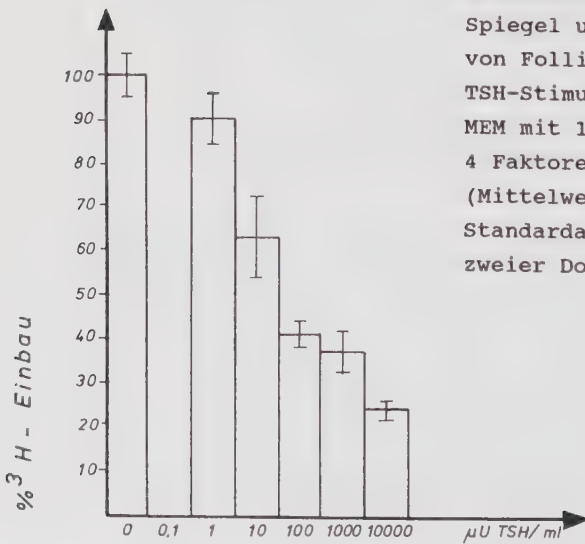


Abb.12b: Zusammenhang zwischen extrazellulärem cAMP-Spiegel und Wachstum von Follikeln unter TSH-Stimulation in MEM mit 1% FKS und 4 Faktoren (Mittelwerte und Standardabweichung zweier Doppelansätze)



ad b) Einfluß von 2'-5'-Dideoxyadenosin (DDA) auf die cAMP-Bildung und auf den ^3H -Thymidin-Einbau
 DDA ist ein Adenosin-Nucleosid und stellt ein inhibierendes Agens für die Adenylatzyklase dar (Fain 1972). Somit sollte durch DDA auch der intrazelluläre basale oder stimulierte cAMP-Spiegel vermindert werden können.

Intrazellulärer cAMP-Spiegel (Abb. 12a):

Bereits der basale intrazelluläre cAMP-Gehalt von ca. $1,5\text{pMol}/\mu\text{g}$ DNA war in Follikeln durch $20\ \mu\text{M}$ DDA auf unter $1\text{pMol}/\mu\text{g}$ DNA herabgesetzt.
 Auf 10-minütige Stimulation mit $1\ \text{mU/ml}$ TSH zeigte sich ein Anstieg des cAMP von $1,5\text{pMol}$ auf $16\text{pMol}/\mu\text{g}$ DNA. Auch der durch TSH ($1\ \text{mU/ml}$) auf $16\text{pMol}/\mu\text{g}$ DNA stimulierte cAMP-Gehalt wurde durch DDA reduziert: durch 5 und $20\ \mu\text{M}$ DDA auf jeweils $9\ \text{pMol}$, durch $40\ \mu\text{M}$ DDA auf ca. 7pMol cAMP pro μg DNA.

DNA-Synthese:

Follikel wurden in MEM mit 3 Faktoren und Insulin inkubiert. Durch DDA ($20/40\ \mu\text{M}$) wurde die Adenylatzyklase gehemmt, d.h. die cAMP-Bildung herabgesetzt.
 Hier wurde der ^3H -Thymidin-Einbau unter $20\ \mu\text{M}$ DDA auf 3,5-fach, unter $40\ \mu\text{M}$ DDA auf das 5,5-fache gesteigert (Abb.13).

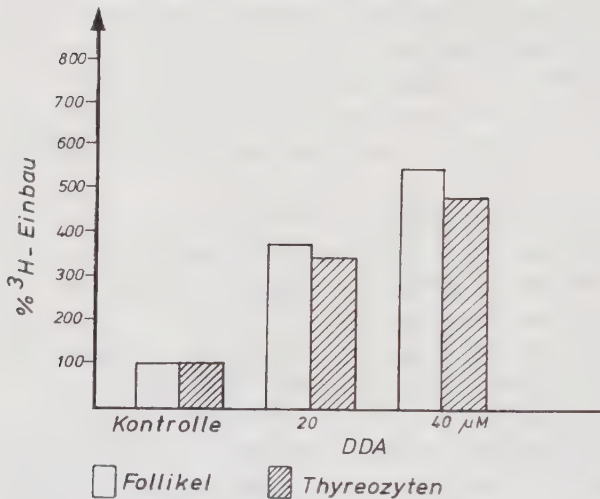


Abb.13: ^3H -Thymidin-Einbau unter cAMP-Hemmung durch DDA in Follikel (ca.70000EZ) und Thyreozyten (50000EZ) in MEM ohne FKS, mit 3 Faktoren und Insulin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Kontrolle=Foll.bzw.Thyreozyt. mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ins.) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

In Medium ohne FKS mit 3 Faktoren und Insulin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) steigerte bereits 20 μM DDA das Insulin-stimulierte Thyreozyten-Wachstum 3-fach, 40 μM DDA sogar fast 5-fach (Abb. 13).

In Medium mit 1% FKS ohne Faktoren wurde reinen Thyreozyten (50000EZ) 40 μM DDA zugegeben. Dabei steigerte sich das durch FKS stimulierte Wachstum auf das 3-fache (ohne Abbildung).

Auch das Fibroblasten-Wachstum wurde in MEM mit 1% FKS (keine weiteren Faktoren) durch cAMP-Hemmung beeinflusst:

Auf Zugabe von 40 μM DDA wurde das FKS-stimulierte Wachstum aber nur auf das 2,5-fache gesteigert.

Auch hier entspricht die Wachstumssteigerung etwa der in reinen Thyreozyten unter gleichen Bedingungen.

ad c) Direkte Adenylatzyklase-Stimulation durch Forskolin und Akkumulation von cAMP durch Isobutylmethylxanthin (IBMX)

Forskolin ist ein nicht spezifischer, reversibler Aktivator der Adenylatzyklase in Zellmembranen. Es benötigt hierzu keinen membranständigen Rezeptor (Daly 1984).

Durch IBMX wird die cAMP-abhängige-Phosphodiesterase gehemmt, die das cAMP intrazellulär abbaut. Unter Stimulation der Adenylatzyklase und Hemmung der Phosphodiesterase läßt sich eine intrazelluläre cAMP-Akkumulation herbeiführen (Rapoport 1984).

In unstimulierten Follikeln war durch Forskolin (0,25 und 0,5 μM) die Adenylatzyklase direkt stimulierbar: Der Basalgehalt an intrazellulärem cAMP von ca. 1,5 pMol wurde nach Stimulation mit Forskolin (0,5 μM) für 10 min. bis auf 6 pMol cAMP pro μg DNA erhöht (Abb. 12a).

Das Wachstum Insulin-stimulierter Follikel-Kulturen in MEM mit 3 Faktoren wird durch cAMP-Stimulation beeinflusst: Forskolin (20 μM) setzte die ^3H -Thymidin-Inkorporation auf 0,7-fachen, 40 μM Forskolin sogar auf 0,3-fachen Kontrollwert herab (Abb. 14).

Bei zusätzlicher Inkubation mit IBMX war dieser hemmende Effekt auf den ^3H -Thymidin-Einbau noch stärker ausgeprägt (Abb. 14).

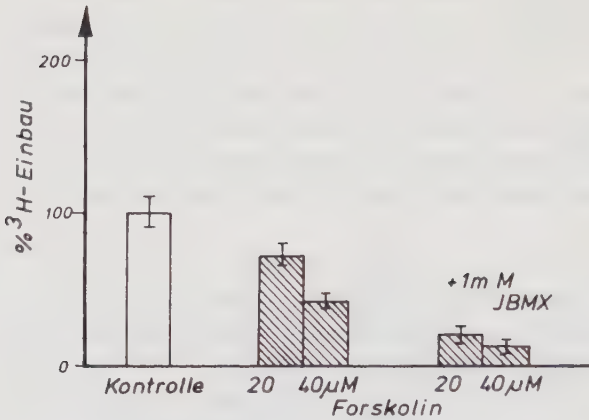


Abb.14: Wachstumseinfluß der cAMP-Stimulation und Akkumulation in Follikeln unter Insulin (10µg/ml)
 (Kontrolle=Follikel unter Insulin 10µg/ml)
 (Mittelwert und Standardabweichung zweier Doppelansätze)

Die Inkubation der Follikel in MEM mit Insulin (10µg/ml) ohne FKS wurde mit Forskolin unter 0,5mM IBMX untersucht. Hier war also der Abbau des durch Forskolin induzierten cAMP behindert, d.h. cAMP akkumulierte. Das Wachstum war unter cAMP-Akkumulation bis auf 0,12-fach reduziert (Abb.14).

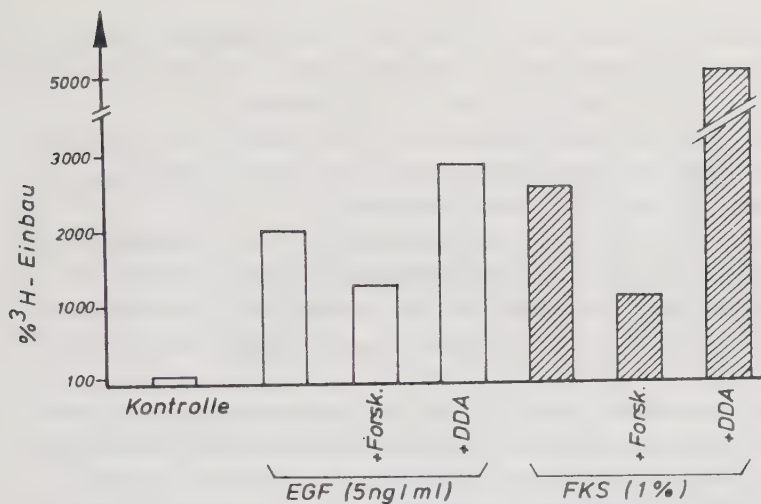


Abb.15: Effekt von DDA und Forskolin auf EGF- und FKS-stimulierten ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel in MEM ohne Faktoren
(Kontrolle=Follikel unstimuliert in MEM ohne F.)
(Mittelwerte eines Doppelansatzes)

Auch der wachstumsstimulierende Effekt von FKS oder EGF war durch Forskolin-induzierte cAMP-Bildung hemmbar (Abb. 15):

Der Stimulationseffekt von 1% FKS wurde durch 20 μM Forskolin von 25-fach auf rund 10-fach gehemmt, die 20-fache Wachstumsstimulation durch 5 ng/ml EGF auf 12-fach reduziert.

Ebenso wurde das Wachstum reiner Thyreozyten in MEM mit 1% FKS unter cAMP-Stimulation gehemmt:

Durch Forskolin (5/20/40 μM) reduzierte sich der FKS-stimulierte ^3H -Thymidin-Einbau auf 0,6-/0,5-/0,3-fachen Ausgangswert (Abb.16).

Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten wurden ebenfalls in MEM mit 1% FKS inkubiert, die Adenylatzyklase mit Forskolin (5/20/40 μM) gehemmt:

Die ^3H -Thymidin-Einbaurate war hier durch 5 μM Forskolin auf 0,6-fach, durch 20 μM auf 0,4-fach und durch 40 μM sogar bis auf 0,07-fach reduziert.

Die zusätzliche Gabe von 1mM IBMX zu o.g. Inkubationsansatz steigerte den Hemmeffekt des cAMP, wodurch das Wachstum auf 0.08-fach bei 5 μM Forskolin, 0,03-fach bei 20 μM und 0,02-fach bei 40 μM gehemmt wurde (Abb.16).

Der wachstumshemmende Effekt der cAMP-Stimulation durch Forskolin und besonders die cAMP-Akkumulation durch IBMX ist bei Follikeln, reinen Thyreozyten und Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten gleichermaßen hochsignifikant.

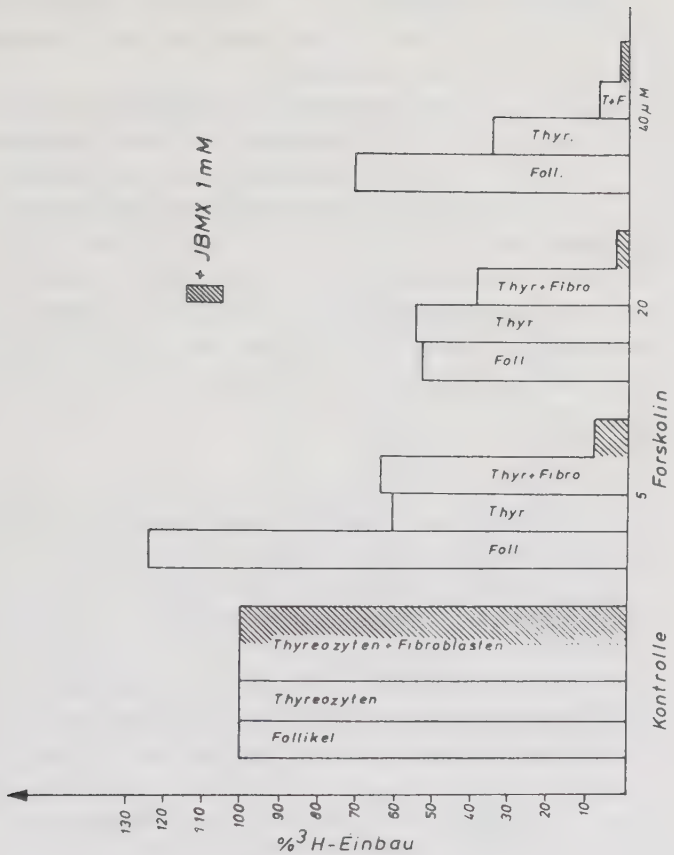


Abb.16: Einfluß von cAMP-Spiegel-Erhöhung durch Forskolin auf die DNA-Synthese verschiedener Zellarten in MEM mit 1% FKS ohne weitere Faktoren (Kontrolle=jeweilige Zellen unter 1% FKS) (Mittelwerte eines Doppelansatzes, schraffierte Säulen: Thyrozyten mit parafollikulären Zellen mit zusätzl. 1mM IBMX)

ad d) Direkte Stimulation der Adenylatzyklase durch Cholera-toxin

Reine Thyreozyten wurden in MEM ohne FKS mit 3 Faktoren und Insulin (10µg/ml) inkubiert:

Das mit Insulin stimulierte Wachstum wurde durch die cAMP-Stimulation durch Cholera-toxin nur mäßig unterdrückt: 10ng/ml Cholera-toxin führten zu 0,99-fachem, 50ng/ml zu 0,78-fachem und 100ng/ml zu 0,74-fachem Wachstum (Abb.17).

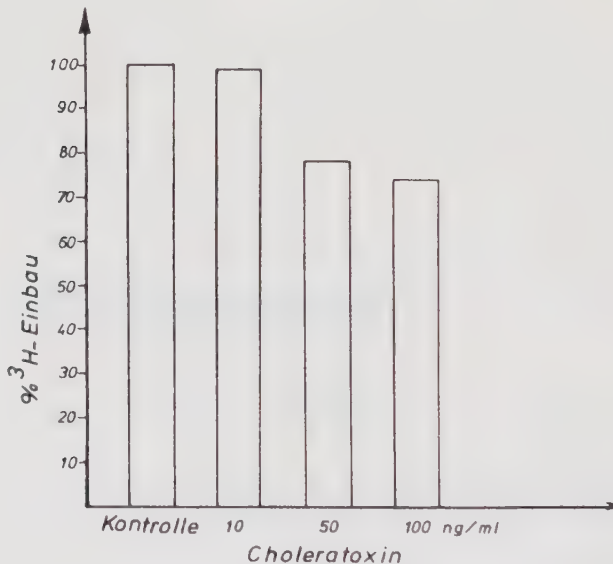


Abb.17: Wachstumshemmung durch cAMP-Stimulation durch Cholera-toxin in Thyreozyten in MEM ohne FKS mit 3 Faktoren und mit Insulin (Kontrolle=Thyreozyten unter 10µg/ml Insulin) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

Analog führte in Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten 100ng/ml Choleratoxin lediglich zu 0,9-fachem Wachstum.

Der Einfluß von Choleratoxin auf Follikel wurde nicht untersucht.

Die Wachstumshemmung durch Choleratoxin-induzierten cAMP-Anstieg fällt geringer aus, als nach den Ergebnissen für Forskolin-induzierte Wachstumshemmung zu erwarten wäre. Dennoch wird das identische Wachstumsverhalten von Thyreozyten mit und ohne Fibroblasten, und damit der geringe Einfluß der parafollikulären Fibroblasten deutlich.

ad e) Einfluß von dibutyryl-cycloAMP auf den ^3H -Einbau
In MEM mit 1% FKS ohne weitere Faktoren wurden Thyreozyten mit parafollikulären Fibroblasten inkubiert. Durch Zugabe von 40 μM dBcAMP soll die Wirkung des cAMP nachgeahmt werden.

Analog zum cAMP hemmt auch das synthetische dBcAMP den Einbau von ^3H -Thymin: Die durch FKS-induzierte Einbaurate wird durch 40 μM dBcAMP auf 0,8-fache Einbaurate herabgesetzt.

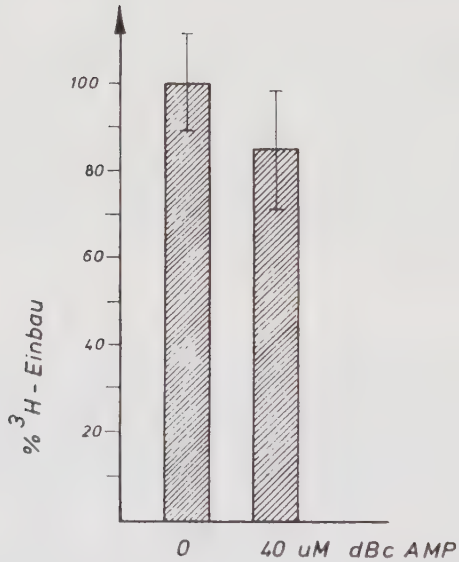


Abb.18: Nachahmung der cAMP-Wirkung durch 40 μ M dBcAMP:
Hemmung der DNA-Synthese in Thyreozyten mit
parafoollikulären Fibroblasten in MEM mit 1% FKS
ohne weitere Faktoren
(Mittelwerte und Standardabweichung zweier
Doppelansätze)

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rolle des cAMP-Systems in der Regulation der DNA-Synthese (Abb.19)

Das TSH stimulierte in den isolierten Follikeln die Adenylatzyklase und erhöhte damit den cAMP-Gehalt signifikant. Dabei wurde jedoch die durch FKS und Insulin induzierte DNA-Synthese deutlich gehemmt. TSH erwies sich somit nicht als stimulierender Faktor für Follikel-Wachstum.

DDA bzw. Senkung des cAMP-Spiegels steigerte das Wachstum von Follikeln und reinen Thyreozyten signifikant.

Der hemmende Einfluß des cAMP und damit die Steigerungsfähigkeit des Wachstums durch cAMP-Hemmung schien in Follikeln größer zu sein als in Thyreozyten.

In humanen Fibroblasten jedoch scheint das cAMP-System eine andere Rolle in der Wachstumsstimulation zu spielen: Das durch 1% FKS in Fibroblasten stimulierte Wachstum wurde durch 40µM Forskolin auf 1,7-fach gesteigert! Während also cAMP-Abnahme durch DDA zu 2,5-fachem Wachstum führte, scheint cAMP-Erhöhung durch Forskolin das Wachstum ebenfalls zu steigern. Eine konzentrationsabhängige Regulation des Wachstums von Fibroblasten durch cAMP erscheint hier eher unwahrscheinlich.

Damit unterscheidet sich die Wachstumsregulation in Fibroblasten deutlich von der in Follikeln und Thyreozyten.

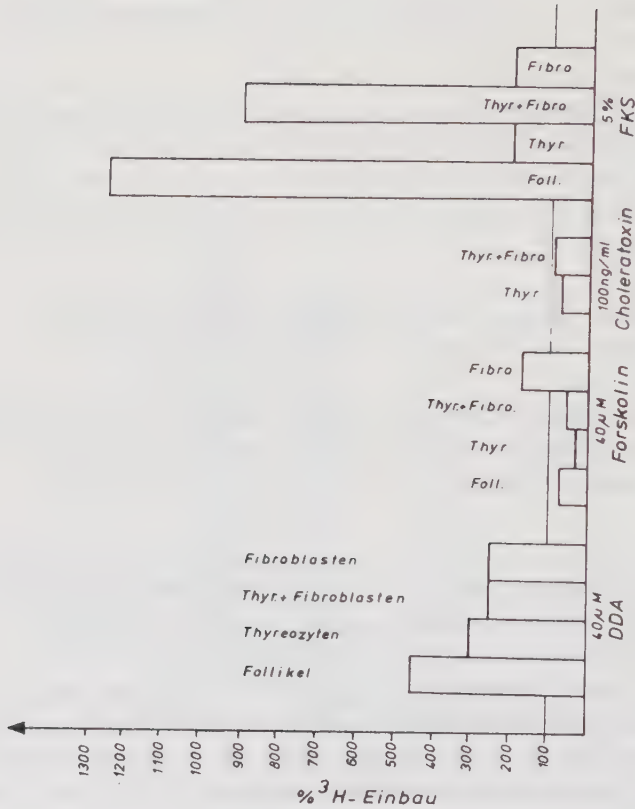


Abb.19: Einfluß der Adenylatzyklase-Hemmung bzw. -Stimulation auf den ^3H -Thymidin-Einbau unter 5% FKS in verschiedene Zellarten (100% = ^3H -Thym.-Einbau in die jeweilige Zellart unter 1% FKS ohne weitere Faktoren) (Mittelwerte eines Doppelansatzes)

3.5.2 Die Rolle des Jod bei der Wachstumsregulation

In den funktionellen Untersuchungen (siehe Jodaufnahme 3.2) hatten isolierte Follikel ihre physiologische Funktion, nämlich Jodidaufnahme und -Einbau, besser erhalten als isolierte Thyreozyten. Deshalb wurden auch die Untersuchungen zur Wachstumsregulation durch Jodid mit Follikeln durchgeführt:

An isolierten Follikeln sollte der Einfluß verschiedener Jodid-Konzentrationen auf das Wachstum untersucht werden.

Durch PTU (Propylthiouracil) wurde die Organifizierung des in die Follikelzellen aufgenommenen Jodid verhindert, wodurch der Einfluß des intrazellulären, freien Jodids von der Wirkung jodierter Verbindungen unterschieden werden sollte.

Der Einfluß von Jodid auf die DNA-Syntheserate unter TSH, Insulin oder EGF wurde ebenfalls untersucht.

a) Frisch isolierte Follikel wurden für 24 Stunden in MEM mit 1% FKS und $10\mu\text{M}$ KJ vorinkubiert, danach werden die Follikel 2x gewaschen und in 3F-Medium mit steigender Jodid-Konzentration (0,1/1/10/40 μM KJ) für 72 Stunden mit ^3H -Thymidin inkubiert und der Einbau des ^3H -Thymidin bestimmt.

Durch FKS (1%) wurde der ^3H -Einbau auf 4000% stimuliert. Diese 40-fache Wachstumsstimulation wurde bei niedrigen KJ-Konzentrationen (0,1 und 1 μM) auf über 50-fach gesteigert.

In höheren KJ-Konzentrationen (10 und 40 μM) trat eine deutliche Wachstumshemmung von 45-fach auf 33-fach ein. (Abb.20)

Wurde der Jodeinbau durch 10uM PTU verhindert, so hatte bei Inkubation ohne Jod bzw. bei niederen KJ-Konzentrationen (0,1/1 μ M) das FKS (1%) noch deutlich stärkere Stimulationswirkung (53-fach). Dieser Effekt ist möglicherweise durch PTU selbst bedingt, da bei Kontrollinkubation ohne FKS das PTU einen schwachen stimulierenden Effekt auf den 3 H-Thymidin-Einbau zeigte (ca.120-140% der Kontrolle, Abb. nicht gezeigt).

Die wachstumshemmende Wirkung bei höheren KJ-Konzentrationen unter PTU war völlig aufgehoben (Abb.20).

Das Jodid zeigte damit nur bei Einbau in eine intrazelluläre Verbindung und bei höherer Jodkonzentration einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum.

Bei niedrigen Konzentrationen, stimulierte es das Zellwachstum.

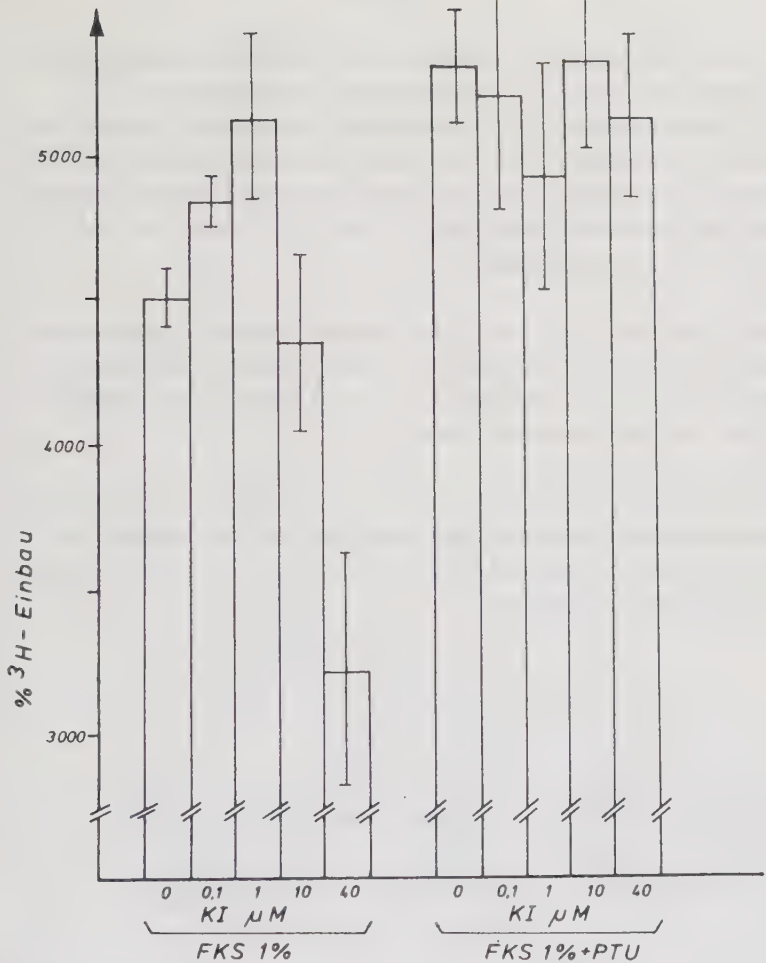


Abb.20: Einfluß von Jodid mit und ohne Hemmung der Organifikation auf den ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel in MEM ohne weitere Faktoren Stimulation erfolgte mit 1% FKS, Organifikationshemmung mit 10 μM PTU (100%=Follikel in MEM ohne Stimulation) (Mittelwerte und Standardabweichung zweier Doppelansätze)

b) Der Einfluß von TSH unter Jodid wurde an Follikel in serumfreiem MEM ohne weitere Faktoren getestet.

In aufsteigender KJ-Konzentration (0/1/10/40 und 80 μM) zeigte hier 100 $\mu\text{U/ml}$ TSH einen geringen Anstieg des ^3H -Thymidin-Einbaus (Abb.21). Der hemmende Einfluß von TSH auf den ^3H -Thymidin-Einbau (s.Abb.11 u.12b) ist somit durch Jodid aufgehoben.

Analog wurden Follikel unter aufsteigender KJ-Konzentration (0/1 und 10 μM) mit 10 ug/ml Insulin inkubiert. Bereits ab 1 μM KJ zeigte sich eine Hemmung des Insulin-stimulierten Wachstums (Abb.21).

Die stimulierende Wirkung von EGF (5ng/ml) auf rund 17-faches Wachstum wurde, ähnlich der des FKS, durch niedermolares KJ (1 μM) auf 14-fach, durch 40 und 80 μM KJ bis auf 7-fach gehemmt.

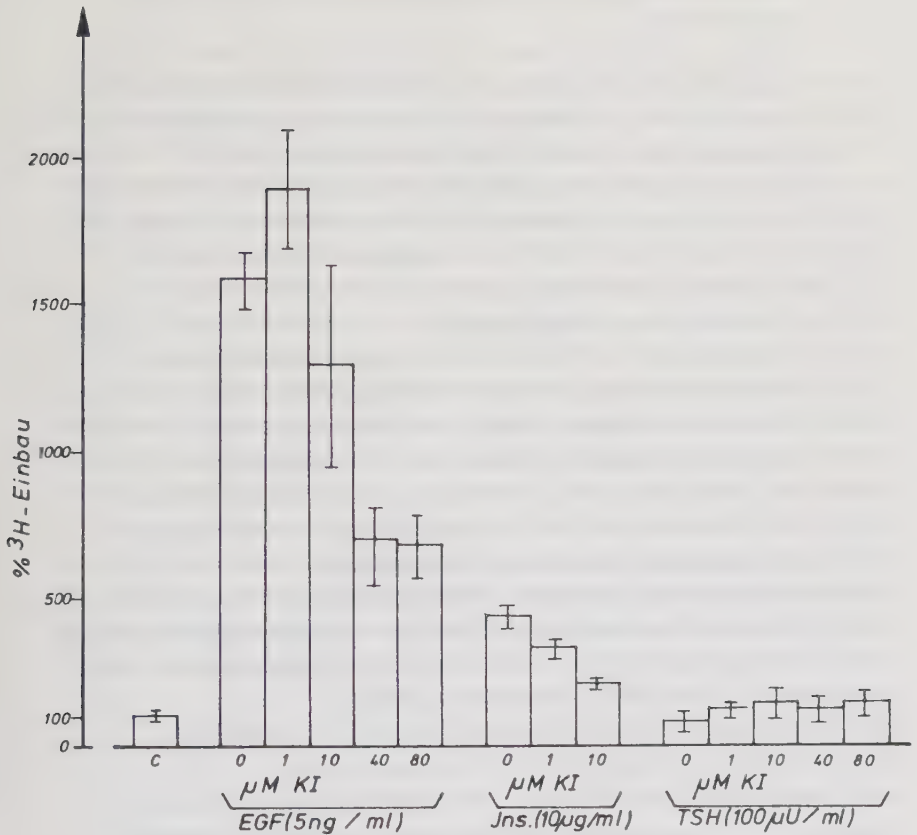


Abb.21: Einfluß von Jodid auf Insulin-, EGF- oder TSH-stimulierte DNA-Synthese der Follikel in MEM ohne FKS oder weitere Faktoren
(100%=Follikel in MEM ohne Stimulation)
(Mittelwerte und Standardabweichung zweier Doppelansätze)

3.5.3 Wachstumssteuerung durch Arachidonsäure-Metaboliten

In den letzten Jahren wurde die zentrale Bedeutung der Arachidonsäure als Vorläufer für Mediatoren verschiedener Zellfunktionen erkannt (nach Samuelsson 1982):

Bekannte Metaboliten der Arachidonsäure sind die Prostaglandine und die Thromboxane (auf einem durch Cyclooxygenase katalysierten Stoffwechselweg gebildet), sowie die Leukotriene und andere hydroxylierte Fettsäuren (durch Lipxygenase katalysiert).

Die Prostaglandine hatten auf bestimmte Fibroblasten-Linien wachstumsstimulierenden Effekt, nicht aber auf Hunde-Thyreozyten (Roger 1984). An Colon-Epithelzellen wurde wachstumshemmende Wirkung von Prostaglandinen entdeckt. Diese war mit Indometazin oder Acetylsalicylsäure, den Hemmstoffen der Prostaglandin-synthetisierenden Cyclooxygenase, aufgehoben (DeRubertis 1984).

Leukotriene wurden zunächst in Makrophagen und Lymphozyten entdeckt (Hansson 1984). Für Colon-Epithelzellen wurde DNA-Synthese-Steigerung durch die Lipxygenase-Produkte nachgewiesen (DeRubertis 1984).

In Ratten-Thyreozyten wurde ein jodierter Arachidonsäure-Metabolit nachgewiesen (Boeyneams 1981).

Wir nutzten die Möglichkeit, durch Hemmung der Cyclooxygenase bzw. Lipxygenase mit bestimmten Blockern einen Einfluß der Arachidonsäure-Metaboliten auf das Wachstum von Follikeln zu untersuchen.

Blockierung der Cyclooxygenase durch Indometazin

Die Rolle der Prostaglandine in der Steuerung der DNA-Synthese von Schilddrüsen-Follikeln sollte nun untersucht werden:

Follikel in serumfreiem MEM ohne weitere Faktoren wurden durch EGF (5ng/ml) und Insulin (10µg/ml) stimuliert. Dazu wurde Indometazin in den Konzentrationen 1, 10, 100, 200 und 400 µM gegeben.

Die 30-fache Wachstumsstimulation durch EGF und Insulin wurde durch Indometazin (1-100µM) bis auf 35-fach gesteigert (Abb.22).

In Dosen von 200 und 400 µM wurde die DNA-Synthese gehemmt. Vermutlich kam diese Wachstumshemmung durch den toxischen Effekt des Indometazins in hohen Konzentrationen zustande.

Blockierung der Prostaglandin-Synthese führt somit nicht zur Wachstums-Hemmung, was also gegen direkte Beteiligung der Prostaglandine als Mediatoren der Wachstumsstimulation spricht.

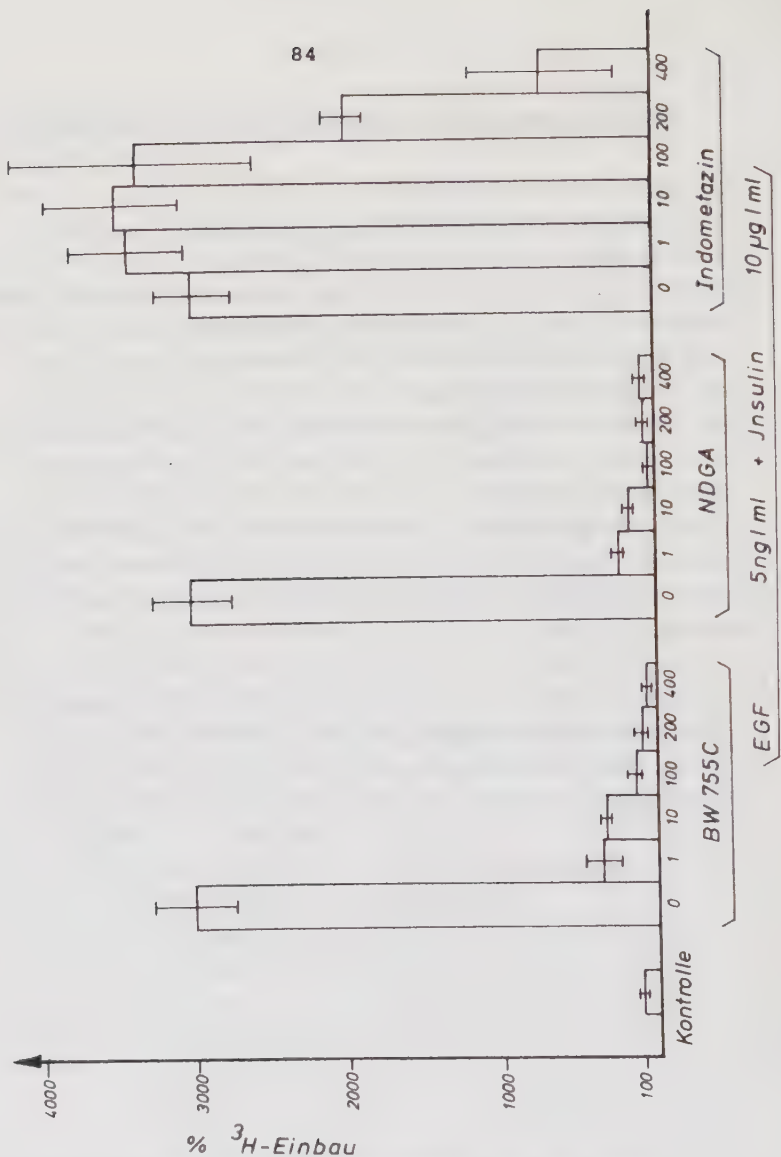


Abb.22: Einfluß von Lipoxxygenase-Hemmern (BW755C und NDGA) und Cyclooxygenase-Hemmern (Indometazin) auf den ^3H -Thymidin-Einbau in Follikel in MEM stimuliert mit EGF(5ng/ml) und Insulin(10 μg /ml) (100%=Follikel ohne Stimulation) (Mittelwerte und Standardabweichung zweier Doppelansätze)

Blockierung der Lipoxxygenase durch BW755C und
Nordihydroguarareticsäure (NDGA)

Hemmung der Metabolisierung der Arachidonsäure durch die Lipoxxygenase (z.B. zu Leukotrienen) ist durch BW755C oder NDGA möglich (Hansson 1984). Sind Lipoxxygenase-Produkte intrazelluläre Mediatoren der Wachstumsstimulation, so müßte ihr Ausfall eine Wachstumshemmung bewirken.

In serumfreiem MEM mit 3 Faktoren wurde zu mit Insulin $10\mu\text{g/ml}$ stimulierten Follikeln $100\mu\text{M}$ BW755C gegeben. Die Insulin-Stimulation der Follikel wurde dabei auf 0,1-fach supprimiert.

Auch Zugabe von $10\mu\text{U/ml}$ TSH unter gleichen Inkubationsbedingungen hatte keinen Einfluß auf die Wachstumshemmung durch BW755C.

Als weiterer Versuch wurden die Follikel in serumfreiem MEM mit 3 Faktoren, Insulin ($10\mu\text{g/ml}$) und EGF (5ng/ml) stimuliert und mit 1, 10, und $100\mu\text{M}$ BW755C oder mit $100\mu\text{M}$ NDGA inkubiert.

Hier war durch EGF und Insulin eine Stimulation auf 30-fachen Basaleinbau zu verzeichnen, die durch $1\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ BW755C auf 3-fach, durch $100\mu\text{M}$ BW755C auf 1-fach reduziert war.

NDGA ($100\mu\text{M}$) supprimierte das 30-fache Wachstum auf 0,5-fach (Abb.22).

Auch reine Thyreozyten wurden in serumfreien MEM mit 3 Faktoren inkubiert und mit Insulin (10ng/ml) stimuliert.

Durch BW755C (100 μ M) wurde der Stimulationseffekt des Insulins auf 0,3-fach reduziert.

BW755C und besonders NDGA hemmen also das durch EGF und Insulin stimulierte Wachstum sowohl in Follikel, als auch in Thyreozyten dosisabhängig und signifikant. Dies deutet auf eine wesentliche Rolle der durch Lipoxigenase produzierten Arachidonsäure-Metaboliten in der Wachstumsregulation hin.

4 DISKUSSION

Charakterisierung eines in-vitro-Modells der Schilddrüse zur Untersuchung der Wachstumsregulation

Anhand von in-vivo Untersuchungen am Tier bestehen bezüglich der Wachstumsregulation der Schilddrüse noch offene Fragen. Im Gesamt-Organismus ist die Rolle einzelner Wachstumsfaktoren kaum vom Zusammenwirken vieler Faktoren abzugrenzen und selektiv untersuchbar. Deshalb wurden verschiedene in-vitro-Modelle zur Untersuchung der Wachstumsregulation der Schilddrüsenzellen entwickelt. Prinzipiell wurden drei verschiedene Ansätze gewählt, nämlich Einzelzellkulturen, Organschnitte und Follikelkulturen:

Schon 1959 zeigte Pulvertaft, daß durch Trypsin-Verdauung menschlicher Schilddrüsen Thyreozyten mit erhaltener Zellfunktion (Jodaufnahme und -verwertung) isoliert werden können. Ebenfalls erhaltene Zellfunktion wiesen die in den Jahren 1961 bis 1971 enzymatisch und mechanisch aus Schilddrüsen verschiedener Spezies isolierten Thyreozyten auf (Überblick in Tong 1974). Einzelzellen wurden als "Monolayer" (siehe Tong 1974), also mit Anhaftung der Zellen am Kulturgefäß, oder in Suspension (Chambard 1983) kultiviert. In diesen Kulturansätzen waren neben den Thyreozyten vermutlich auch parafollikuläre Zellen enthalten.

Organschnitte (Alm 1970, vanSande 1983) werden dem Aufbau der Schilddrüse aus Follikel und parafollikulärem Gewebe gerecht.

Zum Ablauf der spezifischen Funktionen der Schilddrüse ist vor allem der morphologische Aufbau der Follikel notwendig (Ekholm 1979, Ericson 1981). In Kulturen von Einzelzellen geht nicht nur die polare Zellstruktur der aus den Follikel isolierten Thyreozyten verloren, sondern auch der geordnete Ablauf der Hormonsynthese, -speicherung und -sekretion. Daher wurde in mehreren Präparations-Methoden versucht, die Follikelstruktur zu erhalten (Denef 1980, Nitsch 1980, Valente 1983a+b).

In Schilddrüsen-Follikel-Kulturen (Herzog und Miller 1981, Ekholm 1979 u. 1981, Wollman 1980) werden Follikel als kleinste Funktionseinheit der Schilddrüse betrachtet. Häufig wurden jedoch die Schilddrüsen-Follikel dennoch bei der Präparation aufgebrochen und die sog. Follikelsegmente reorganisierten sich innerhalb von 24 Stunden. Die so isolierten Follikel hatten ihre physiologische Polarität häufig verloren, d.h. die zuvor lumenwärts gewandte apikale Thyreozytenmembran war zum Medium gerichtet, die basolaterale Membran lumenwärts. Die Ursache für diese Polaritätsumkehr blieb bisher ungeklärt (Herzog 1981, Chambard 1983).

In unserem Labor wurde deshalb eine Methode erarbeitet, mit der die Wahrscheinlichkeit einer mechanischen Eröffnung der Follikel bei der Präparation gering gehalten wird und größtenteils Follikel mit physiologischer Polarität ("right-side-right") isoliert werden (Greil 1984b, Gärtner 1985a).

Diese Follikel erwiesen sich bei erhaltener Polarität am ehesten repräsentativ als Funktionseinheit der Schilddrüse (Gärtner 1985a, Greil 1984a, Karlsson 1982): Auf Stimulation mit dem rezeptorabhängigen TSH folgt cAMP-Akkumulation, Jodorganifizierung und Kolloidbildung, sowie Freisetzung von Schilddrüsen-Hormonen.

Rezeptorlokalisation und Anhaftung von Monolayer-Kulturen

In Monolayer-Kulturen waren unsere Thyreozyten durch Rezeptor-abhängige Wachstumsfaktoren weniger zur DNA-Synthese stimulierbar als Follikel, während nicht rezeptor-vermittelte Agenzien (Forskolin, Choleratoxin, DDA) in beiden Kulturen gleich effektiv waren.

Dieses Ergebnis deutet auf unterschiedliche Zugängigkeit der spezifischen Rezeptoren hin. Nachdem Thyreozyten in Suspension über die Rezeptoren stimulierbar sind (Chambard 1983), ist für Monolayer-Kulturen eine sterische Rezeptor-Inhibierung anzunehmen.

Die aufgehobene Stimulierbarkeit von Thyreozyten durch TSH bzw. EGF weist auf Blockierung der an der basolateralen Membran lokalisierten Rezeptoren hin (Chambard 1983 bzw. Westermarck 1986), die Thyreozyten haften also im Monolayer vermutlich mit der basolateralen Membran an der Kulturschale. Bei Inkubation von Follikeln erfolgt die Stimulation der Follikel zunächst in Suspension, d.h. die basolaterale, rezeptor-tragende Membran ist dem Medium zugewandt, und TSH bzw. Wachstumsfaktoren können an ihren Rezeptor binden. Entstehen Monolayer, indem Thyreozyten aus dem Follikelverband auswachsen, sind zumindest die noch im Follikel gebundenen Thyreozyten mit der Rezeptoren-tragenden Membran dem Medium zugewandt: diese Zellen sind über ihre Rezeptoren stimulierbar.

Wesentliche Voraussetzungen für Wachstumsvergleiche

Um möglichst deutliche Wachstumsunterschiede auf die verschiedenen Testsubstanzen erkennen zu können, muß die Inkubationsdauer einen Zeitraum umfassen,

- in dem sich stimulierter, unstimulierter und gehemmter ^3H -Thymidineinbau deutlich voneinander absetzen
- in dessen Verlauf die Kulturen noch nicht die ganzen Schalen erfüllen, so daß eventuell Kontakt der Zellen zu Wachstumshemmung führt und die Stimulatorwirkung der Testsubstanz verfälscht würde.
- den die Schilddrüsen-Follikel und -Zellen unter in-vitro-Verhältnissen überleben.
- während dem die essentiellen Bestandteile des Mediums, also besonders Glucose und Aminosäuren, nicht völlig erschöpft werden.

Beeinflussende Faktoren eines Wachstumsassays

Versuche mit sog. "Biomatrix" (Extrakte von Gerüstprotein, Kollagen, Laminin, Fibronectin u.a.) haben gezeigt, daß durch Anhaftung von Zellen an diese Matrix die Hormonrezeptoren stabilisiert werden (Reid 1981). Bei Langzeit-Kultur differenzierter Zellen (z.B. Hepatozyten in Rojkind 1980) erwies sich diese Biomatrix als unbedingt notwendig. Ohne Matrix verloren die Zellen nach wenigen Wochen die Differenzierung, während sie mit Matrix 5 Monate in-vitro kultivierbar waren.

Auch humane Fibroblasten (Elsdale 1972) benötigen zum Wachstum in in-vitro-Kulturen eine Matrix. Wie diese Zellsysteme wachsen auch Follikel, die die Kulturschale als Matrix nützen, besser als Follikel in Suspension (Chambard 1981).

Somit erweist sich die Biomatrix nicht nur zum Erhalt der Differenzierung (Reid 1981) als notwendig.

Den Einfluß von Kalzium im Medium haben wir bei zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht (0.3 bzw. 1,8mM), ein wesentlicher Unterschied des Basalwachstums und der Stimulierbarkeit auf Wachstumsfaktoren konnte bei Follikelkulturen nicht gefunden werden. Von vielen Autoren wurde das intrazelluläre Kalzium als "Schlüssel der Proliferation" bezeichnet (Roger 1983, Igarashi 1980, Boynton 1983: Kalzium-abhängige Proteinkinasen bringen das Wachstum in Gang). Die intrazelluläre Kalzium-Vorräte scheinen jedoch zum Wachstumsunterhalt ausreichend, denn es zeigt sich in der Stimulation von Follikeln und von Thyreozyten nur geringe Abhängigkeit vom extrazellulären Kalzium.

Stimulation der DNA-Synthese

Das gebräuchlichste Supplement für Zellkulturen ist das Kalbsserum. Dieses ist allerdings wenig definiert und standardisiert (Hayashi 1978). Eine Gruppe von Wachstumsfaktoren wurde zwar bereits aus dem Serum isoliert, doch konnte bisher nur die Notwendigkeit von Insulin und Transferrin für alle Zelllinien nachgewiesen werden (Barnes 1980). Jedoch genügt die Zugabe dieser Faktoren allein noch nicht, das Wachstum unter fetalem Kalbsserum nachzuvollziehen.

Viele differenzierte Zellen haben sich in-vitro als durch fetales Kalbsserum, durch den epidermalen Wachstumsfaktor und häufig auch durch Insulin zum Wachstum stimulierbar erwiesen (Dumont 1984, Nitsch 1980, Barnes 1980).

Auch in unseren Kulturen waren Thyreozyten und Follikel durch FKS, EGF oder Insulin stimulierbar, Fibroblasten durch FKS und Insulin.

Insulin soll auch einen permissiven Effekt auf die TSH-Wachstumsstimulation haben (Roger 1983, Dumont 1984).

Diesem widersprechen unsere Ergebnisse:

Weder mit Insulin oder FKS, noch mit oder ohne Matrix zeigte sich an Follikeln, Thyreozyten mit oder ohne Fibroblasten ein wachstumsstimulierender TSH-Effekt. Unter Wachstumsstimulation mit 1% FKS und Insulin fanden wir in Follikeln deutliche Wachstumshemmung durch TSH. Ein positiver Wachstumseffekt, wie von Valente (1983 a+b), Doniach (1982) und Nitsch (1980) beschrieben, konnte von uns nicht bestätigt werden. Die von diesen Autoren beobachtete Proliferation auf TSH scheint auch nicht durch parafollikuläre Endothelzellen oder Fibroblasten vermittelt, da wir auch in Mischkulturen aus o.g. Zellen keine Wachstumssteigerung durch TSH ermitteln konnten.

Die Wachstumsstimulation an Hundethyreozyten (Roger 1982b u. 1983, Dumont 1984) könnten speziesspezifisch sein, und wurde auch nicht in serum- und insulinfreiem Medium reproduziert. Hunde-Thyreozyten waren aber auch nicht mit dem allgemein akzeptierten Wachstumsstimulator EGF stimulierbar (Roger 1982 a).

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen an humanen Thyreozyten, die zeigten, daß sowohl TSH als auch andere cAMP-stimulierende Faktoren keine Wachstumsfaktoren sind (Westermarck 1979 u. 1986, Roger 1984): Bei Erhöhung des cAMP durch Forskolin (nach vanSande 1983) oder Choleratoxin, Akkumulation des cAMP durch IBMX ergibt sich Wachstumshemmung. Auch die Nachahmung des cAMP durch dBcAMP zeigt negativen Effekt auf das Wachstum.

Durch Senkung der cAMP-Konzentration durch DDA (nach Fain 1972) ist Wachstumsstimulation durch EGF oder Serum steigerbar. Jedoch durch TSH-induzierte cAMP-Bildung wird die DDA-Wirkung teilweise aufgehoben, d.h. das Wachstum wird enthemmt.

Während cAMP als Mediator des TSH die differenzierte Funktion der Schilddrüse vermittelt (vanSande 1983), hat es auf die Vermehrung vieler Zellsysteme hemmenden Einfluß (Übersicht in Boynton 1983).

Dies ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, daß Thyreozytenwachstum und -differenzierung nicht parallel verlaufen.

Die Proliferationssteigerung durch cAMP in Hepatozyten (Boynton 1983) und Hunde-Thyreozyten (Roger 1982a, 1984 u. 1983) kann zell- bzw. speziesspezifisch sein.

Es wird diskutiert, ob die Regulierung von Wachstum und Differenzierung über zwei spezifische Proteinkinasen, die durch unterschiedliche cAMP-Konzentrationen gesteuert werden, erfolgen könnte (Lohmann 1984): Der cAMP-Spiegel ist innerhalb des Zellzyklus zweimal erhöht, so daß er durch Absinken einen Wachstumsimpuls, durch Ansteigen eine Wachstumshemmung darstellen könnte (Boynton 1983).

Besonders durch EGF-Stimulation verlieren jedoch bei Wachstumssteigerung die Zellen die Fähigkeit, Jodid aufzunehmen und einzubauen (Eggo 1984, Dumont 1984). Roger (1982) fand eine starke Hemmung des durch TSH induzierten aktiven Jodid-Transportes und der Organifizierung von Jodid.

Für die Schilddrüse sind zwei selektiv stimulierbare Zellfunktionen bekannt (Abb.23):

- 1) Das Wachstum, d.h. die Zellvermehrung, wird durch die oben genannten Faktoren EGF und Insulin bzw. einem dem Insulin ähnlichen Faktor (IGF I: insulin-like growth-factor) stimuliert.

Über die Wachstumsstimulation durch TSH wird noch spekuliert.

- 2) Die Differenzierung, d.h. die Fähigkeit, Schilddrüsen-Hormone zu produzieren, wird durch TSH aufrechterhalten über die Bildung von cAMP (Errick 1986). Auch andere cAMP-Stimulatoren führen zur Schilddrüsen-Hormon-Synthese. Die Hormonsynthese kann auch durch ein Immunglobulin, durch das TSI (thyroid stimulating immunglobulin) stimuliert werden, wie beim M.Basedow bewiesen.

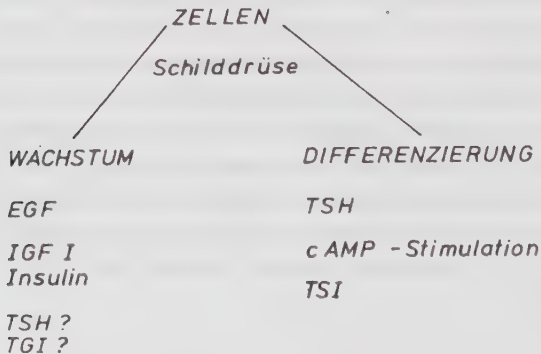


Abb.23: Schema von Wachstum und Differenzierung der Schilddrüsenzelle

Parakrine Wachstumsfaktoren?

Es wurde vermutet, daß vermehrte cAMP-Bildung im para-follikulären Gewebe indirekt zu einem Wachstum der Follikel führt (Krishnaraj 1978, Roger 1982b).

Denn nur 80% des Schilddrüsengewebes sind Follikel (Frieden 1981). Die restlichen 20%, vor allem die Fibroblasten, scheinen eine Rolle in der Wachstumsregulation der gesamten Drüse zu spielen, wie auch in unseren Experimenten mit Monolayer-Kulturen von Thyreozyten mit und ohne para-follikulären Zellen diskutiert wurde.

Die Wachstumsstimulierbarkeit der Thyreozyten in Gegenwart der Fibroblasten ist nicht als Summe aus dem Wachstum der jeweils einzeln kultivierten Zellen zu erklären. Vielmehr ist eine gegenseitige Beeinflussung des Wachstums von Thyreozyten und para-follikulären Zellen anzunehmen, da Co-Kulturen anderes Wachstumsverhalten als Einzelzellkulturen zeigen. Auch wird über einen parakrinen Wachstumsfaktor diskutiert, der im Verlauf der Strumagenese von den Thyreozyten produziert wird und Fibroblasten bzw. Endothelzellen stimuliert (Smeds und Wollman 1983, Many 1984).

Bei jodarm-ernährten Ratten konnte autoradiographisch gezeigt werden, daß vor der Proliferation der Thyreozyten eine Proliferation der Endothelzellen erfolgt (Smeds und Wollman 1983). Dieses Endothelwachstum sei durch ein schilddrüsen-spezifisches Mitogen, das in der Schilddrüse gebildet werde, induziert.

Fibroblasten wiederum können IGF I produzieren, das die Thyreozyten zum Wachstum stimulieren kann (Gärtner 1986).

Obwohl in Kulturen isolierter Schilddrüsen-Follikel die parakrine Beeinflussung des Follikel-Wachstums durch parafollikuläre Zellen vernachlässigt wird, stellt dieses in-vitro-System ein ideales Modell zur Untersuchung einzelner Wachstumsfaktoren dar, da zumindest die kleinste Funktionseinheit betrachtet wird. Dennoch darf natürlich nicht das Vorhandensein dieser parakrinen Faktoren in-vivo außer Acht gelassen werden!

Einfluß von Jodid auf das Zellwachstum

Die Wirkung des Jodids in der Strumagenese ist durch die Tierversuche belegt (Bray 1968).

Auch unter Kulturbedingungen fanden wir durch hohe KJ-Konzentrationen (20-80 μM) verminderte Wachstumsstimulierbarkeit, in niedrigen KJ-Konzentrationen (1-10 μM) jedoch noch zusätzlich gesteigerte Zellproliferation. Bei der Erklärung der Wachstumssteigerung unter geringen Jodkonzentrationen spielt das cAMP-System eine wichtige Rolle: An Rinder-Thyreozyten wurde entdeckt, daß Jodid (10 μM) sowohl die TSH-induzierte Jodidorganifikation hemmt, als auch den cAMP-Gehalt senkt (Sherwin 1975). VanSande postulierte 1983 eine jodierte Verbindung, die nicht mit Schilddrüsen-Hormonen identisch ist und die die Bildung von cAMP hemmt. Durch die Bildung dieser jodierten Verbindung kann der wachstumsstimulierende Effekt bei niedrigen Jodkonzentrationen (0,1-10 μM) erklärt werden, da dadurch der basale cAMP-Spiegel erniedrigt wird und der hemmende Einfluß von cAMP auf das Zellwachstum vermindert wird.

Die Abnahme der DNA-Syntheseleistung unter höheren KJ-Konzentrationen (20-80 μM) ist wahrscheinlich auf den hemmenden Einfluß einer jodierten Verbindung zurückzuführen, denn durch Blockade der Jodorganifikation mit PTU war auch die Hemmung des ^3H -Thymidin-Einbaus aufgehoben. In diesem Zusammenhang erscheint die Identifizierung einer jodierten Verbindung der Arachidonsäure interessant (Boyneams 1981). Durch Jodierung wäre die Arachidonsäure für die Lipoxxygenase nicht mehr als Substrat erkennbar und damit auch nicht mehr metabolisierbar. Die Lipoxxygenase-Produkte wären also vermindert und stünden nicht mehr als Wachstums-Mediator zur Verfügung.

Der hypothalamisch/hypophysär-glanduläre Regelkreis dürfte somit nur für die Steuerung der differenzierten Hormon-Syntheseleistung der Schilddrüse zutreffen. TSH schied zwar nach unseren Ergebnissen als direkter Wachstumsstimulator aus, dennoch könnte TSH indirekt über Jodverarmung der Schilddrüse (durch vermehrte Hormonsynthese) das Wachstum induzieren.

Wachstumssteuerung durch Arachidonsäure-Metaboliten

Als weiterer Mediator der Wachstumsstimulation wurde der Phosphatidyl-Inositol-Umsatz (PI-Umsatz) postuliert (Dumont 1984 / Abb.24):

Für Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF: "platelet derived growth-factor") fand Berridge (1984) als intrazelluläre Wachstumsmediation eine Spaltung von Phosphatidylinositol der Zellmembran zu Diacylglycerol und Inositol-Trisphosphat. Letzteres bewirkt Freisetzung des intrazellulär (im endoplasmatischen Retikulum) gespeicherten Ca^{2+} (Joseph 1984).

Diacylglycerol aktiviert die C-Kinase (die als Cofaktor u.a. Ca^{2+} benötigt), wodurch Proteinphosphorylierung ermöglicht wird.

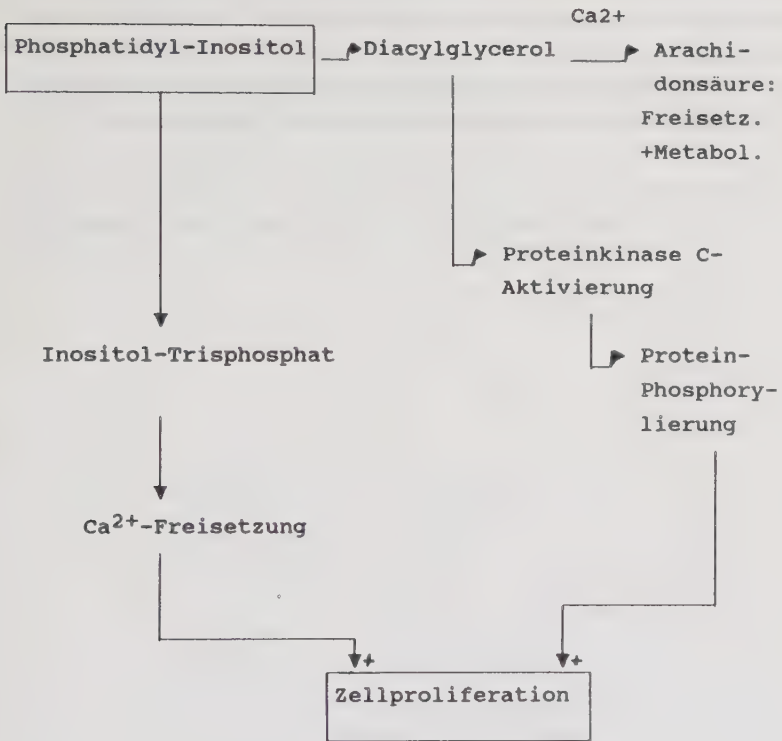
Über Ca^{2+} -Freisetzung und cAMP-Erhöhung wird auch die Proteinkinase A aktiviert. Diese wiederum hemmt, wie an Thrombozyten erforscht wurde, die durch PI-Spaltung stimulierten Zellfunktionen (Nishizuka 1984).

Auch durch Onkogen-Aktivierung können Produkte entstehen, die selbst Proteine des PI-Zyklus darstellen (z.B. als Wachstumsfaktor, Rezeptor oder Tyrosin-Kinase) und somit das Wachstum von Zellen autokrin oder parakrin stimulieren können (Marx 1984).

Für TSH wurde ebenfalls eine Aktivierung des PI-Zyklus an Schilddrüsen-Follikeln beschrieben (Igarashi 1980), doch bisher konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Die oben erwähnte Ca^{2+} -Freisetzung führt auch zur Abspaltung von Arachidonsäure aus Phospholipiden, weshalb Metaboliten der Arachidonsäure (durch Cyclooxygenase oder Lipxygenase gebildet) eine Rolle in der Wachstumsregulation zugeschrieben wird (Samuelsson 1983, Roger 1984).

Überblick über die Verbindung von PI-Spaltung und
Arachidonsäure-Metabolismus:



Die Prostaglandine als Produkte der Cyclooxygenase scheiden nach unseren Ergebnissen als Wachstumsstimulatoren aus, da eine Hemmung der Cyclooxygenase durch Indometazin das Wachstum verhindern müßte (siehe auch Roger 1984).

Indometazin blockiert nach Boynton (1983) an Knochenmarkszellen auch die Bildung von cAMP, wodurch nach o.g. Hypothese und wie in unseren Ergebnissen belegt eine Wachstumssteigerung ermöglicht wird.

Die beobachtete Zunahme des Wachstums läßt sich auch auf die Verlagerung des Arachidonsäure-Metabolismus auf den Lipxygenase-Stoffwechsel zurückführen (Hansson 1984).

An Colon-Epithelzellen hat DeRubertis (1984) beobachtet, daß auf Stimulation der Lipoxxygenase und Bildung von 12-HETE (12-Hydroxy-eicosa-tetraen-Säure) die DNA-Synthese stimuliert wurde, während eine Lipoxxygenase-Hemmung zur Wachstumshemmung führte.

Auch in unseren Schilddrüsen-Follikeln war das durch EGF stimulierte Wachstum durch Blockierung der Lipoxxygenase mit BW755C oder NDGA (nach Hansson 1984) hemmbar. Ob allerdings BW755C oder NDGA auch andere intrazelluläre Stoffwechselwege oder indirekt die Rezeptoren an der Zellmembran beeinflußt, ist bisher noch nicht bekannt.

Abb.24: Übersicht über intrazelluläre Stoffwechselwege und ihren Einfluß auf das Wachstum (Ergebnisse aus der Literatur):

Mit (?) versehene Pfeile stellen vermutete Interaktionen dar.

(+) auf den Pfeilen bedeutet Stimulation

(-) auf abgeblockten Strichen Hemmung.

BW755C	Lipoxygenase-Hemmer
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DDA	2'-5'- Dideoxyadenosin
EGF	Epidermal Growth Factor
IGF I	Insulin-like Growth Factor
Jx	jodierte Verbindung, die zur Hemmung der Adenylat-Zyklase führt
Jy	postulierte jodierte Verbindung, die zur Hemmung des Zellwachstums führt
NDGA	Nordehydroguarareticsäure, Lipoxygenase-Hemmer
PDE	Phosphodiesterasen
PTU	Propylthiouracil
R	spezifische Rezeptoren

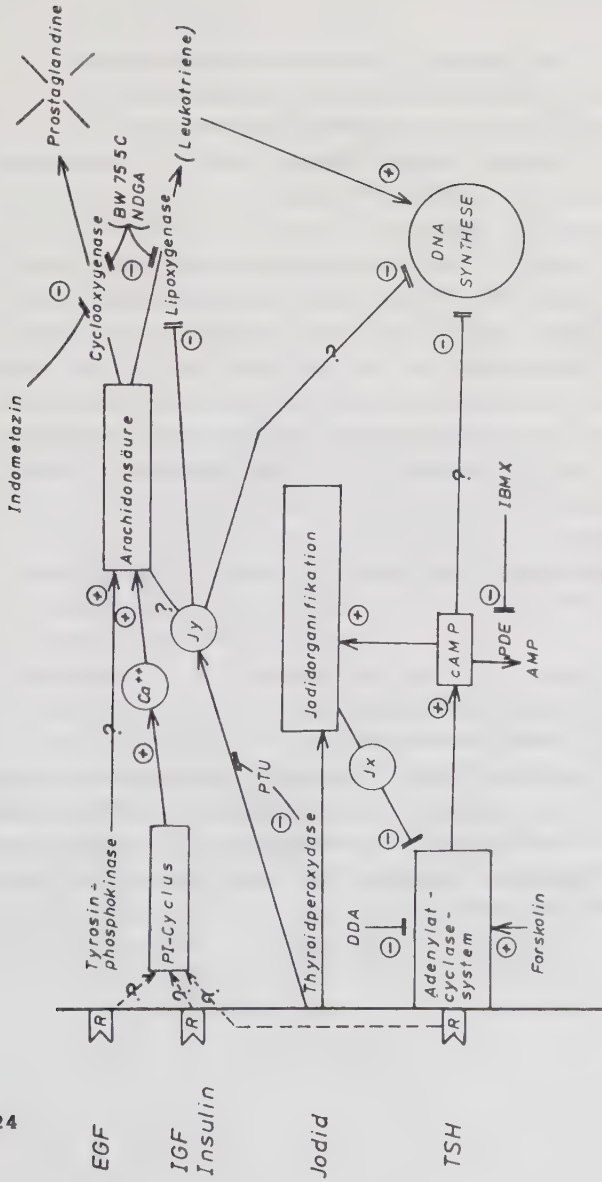


Abb. 24

5 ZUSAMMENFASSUNG

An Zellkulturen wurden Einflüsse und Faktoren des Schilddrüsen-Wachstums *in vitro* untersucht. Dabei wurde die Zusammensetzung der Schilddrüse aus mehreren Zellarten berücksichtigt, indem verschiedene Kulturansätze durchgeführt wurden:

- Reinkulturen in der Polarität erhaltener Follikel wurden durch Kollagenase-Verdauung des parafollikulären Gewebes von Schweineschilddrüsen gewonnen
- Durch Trypsin-Andauung dieser Follikel wurden reine Thyreozyten gewonnen und als Monolayer inkubiert
- In durch mechanische Zerkleinerung von Schilddrüsengewebe gewonnenen Thyreozyten-Monolayern wurden bewußt parafollikuläre Zellen mit in die Kultur genommen
- Humane Fibroblasten wurden parallel in Reinkultur getestet

Für jedes dieser Zellsysteme wurden die notwendigen Kulturbedingungen ausgetestet:

Eine Matrix zum Anhaften wird nur von Fibroblasten unbedingt benötigt. Bei Follikeln führte das Anhaften zu einer fast verdoppelten Stimulierbarkeit der ^3H -Thymidin-Einbaurate. Thyreozyten in Monolayern wuchsen jedoch nach Anhaftung an die Matrix nur noch gering auf rezeptor-vermittelte Stimulation.

Durch Insulin konnte das basale Wachstum der Schilddrüsen-Zellen im Follikelverband bis zu 4-fach gesteigert werden, durch EGF auf das 20-fache.

Durch TSH wurde dosisabhängig das Wachstum von Follikel-Kulturen um bis zu 80% des Kontrollwertes ohne TSH gehemmt. Der wachstumshemmende Einfluß von TSH wurde bei Zugabe von Jodid ($1/10/40$ und $80 \mu\text{M}$) aufgehoben.

Analog zum TSH wurde das Wachstum in allen Follikel- und Thyreozyten-Monolayer-Kulturen auch durch Rezeptor-unabhängige cAMP-Stimulation mit Forskolin oder Chole-ratoxin gehemmt. Umgekehrt wurde bei Hemmung der cAMP-Bildung mit 2'-5'-Dideoxyadenosin das Wachstum gesteigert. Lediglich die Fibroblasten-Reinkulturen zeigten einen geringen Anstieg des ^3H -Thyminidin-Einbaus nach Stimulation des Adenylat-Zyklase-Systems.

Jodid stimulierte in niedrigen Konzentrationen (unter $10 \mu\text{M}$) den ^3H -Thyminidin-Einbau in Follikelkulturen, bei höheren Jodidkonzentrationen wurde das Wachstum gehemmt. Diese Jodideffekte wurden bei Blockade der Jodorganifizierung durch PTU aufgehoben.

Der Einfluß von Arachidonsäure-Metaboliten wurde durch Blockade der Produkte der Cyclooxygenase (durch Indometazin) und der Lipoxxygenase (durch BW755C oder Nordi-hydroguarareticsäure) untersucht :

Durch Hemmung der Cyclooxygenase wurde das durch EGF oder Insulin induzierte Wachstum nicht blockiert. Lipoxxygenase-Hemmung führte zur Reduktion des durch EGF und Insulin stimulierten Wachstums auf den Basalwert.

Die Ergebnisse zeigen, daß in-vitro das Wachstum von Schilddrüsen-Zellen vom Schwein durch cAMP negativ reguliert wird, d.h. daß auch TSH kein Wachstumsfaktor in diesem System ist. Jod hat eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Wachstums, in niedriger Konzentration führt es zu einer geringen Steigerung des Wachstums, in höheren Dosen jedoch zu einer Hemmung. Des weiteren gibt es Hinweise, die für eine Beteiligung von Arachidonsäure-Metaboliten der Lipoxxygenase bei der intrazellulären Signalübermittlung von Wachstumsfaktoren sprechen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AHN C.S., ROSENBERG I.N. (1970)
Iodine metabolism in thyroid slices:
Effect of TSH, dibutyryl cyclic 3'-5'-AMP,
NaF and Prostaglandin E₁
Endocrinol. 86, 396-405
- BARNES D., SATO G. (1980)
Serum-free cell culture: A unifying approach
(Review)
Cell 22, 649-655
- BAUMANN E. (1894)
Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper
Münch.Med.Wschr. 31, 319-330
- BERRIGDE M.J. (1984)
Inositol trisphosphate and diacylglycerol as
second messengers
Biochem.J. 220, 345-360
- BOYNEAMS J.M., PELSTER D., OATES J.A.,
HUBBARD W.C. (1981)
Novel transformations of arachidonic acid
by the rat thyroid in vitro
Biochim.Biophys.Acta 665, 623-627
- BOYNTON A.L., WHITFIELD J.F. (1983)
The role of cyclic AMP in cell proliferation
Adv.Cycl.Nucl.Res. 15, 193-294
- BRAY G.A. (1968)
Increased sensitivity of the thyroid in
iodine-depleted rats to the goitrogenic
effects of thyrotropin
J.Clin.Invest. 47, 1640-1649
- BURTON K. (1956)
A study of the conditions and mechanisms
of the diphenylamin reaction for the colori-
metric estimation of desoxyribonucleic acid
Biochem.J. 62, 315-323
- CHAMBARD M., GABRION J., MAUCHAMP J. (1981)
Influence of collagen gel on the orientation
of epithelial cell polarity:
Follicle formation from isolated thyroid cells
and from preformed monolayers
J.Cell Biol. 91, 157-166

- CHAMBARD M., VERRIER B., GABRION J.,
MAUCHAMP J. (1983)
Polarization of thyroid cells in culture:
Evidence for the basolateral localization of
the iodine "pump" and of the thyroid-stimulating
receptor-adenylcyclase complex
J. Cell Biol. 96, 1172-1177
- CHIOVATO L., HAMMOND L.J., HANAFUSA T.
PUJOL-BORRELL R., DONIACH D., BOTTAZZO G.F. (1983)
Detection of thyroid growth immunoglobulins
(TGI) by ^3H -thymidine incorporation in cultured
rat thyroid cells
Clin. Endocrin. 19, 581-590
- DALY J.W. (1984)
Forskolin, adenylate cyclase and cell physiology:
An overview
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phos. Res. 17, 81-89
- DENEF J.-F., BJÖRKMAN U., EKHOLM R. (1980)
Structural and functional characteristics of
isolated thyroid follicles
J. Ultrastruct. Res. 71, 185-202
- DUMONT J.E., ROGER P., VanHEUVERSWYN B.
ERNEUX C., VASSART G. (1984)
Control of growth and differentiation by
known intracellular signal molecules in
endocrine tissues
The example of the thyroid gland
Adv. Cycl. Nucl. Prot. Phosph. Res. 17, 337-324
- EGGO M.C., BACHRACH L.K., FAYET G., ERRICK J.,
KUDLOW J.E., COHEN M.F., BURROW G.N. (1984)
The effects of growth factors and serum on
DNA synthesis and differentiation in thyroid
cells in culture
Mol. Cell Endocrinol. 38, 141-150
- EKHOLM R. (1979)
Thyroid physiology: Anatomy and development
In: DeGroot L.J. (Ed.)
Endocrinol. 1, 305-309
- EKHOLM R. (1981)
Review: Iodination of thyroglobulin an
intracellular or extracellular process?
Mol. Cell Endocrinol. 24, 141-163

- ELSDALE T., BARD J. (1972)
Collagen substrata for studies on cell behavior
J. Cell Biol. 54, 626-637
- ERICSON L.E. (1981)
Exocytosis und endocytosis in the
thyroid follicle cell
Mol. Cell. Endocrinol. 22, 1-24
- ERRICK J.E., ING K.W.A.,
EGGO M.C., BURROW G.N. (1986)
Growth and differentiation in cultured human
thyroid cells:
Effects of epidermal growth factor and thyrotropin
In vitro Cell. Dev. Biol. 22/I, 28-26
- FAIN J.N., POINTER R.H., WARD W.F. (1972)
Effects of adenosin nucleosides on adenylate
cyclase, phosphodiesterase, cyclic adenosine
monophosphate accumulation and lipolysis in
fat cells
J. Biol. Chem. 247, 6866-6872
- FRIEDEN E. (1981)
Iodine and the thyroid hormones
Trends Biochem. Sci., Vol. 6, 50-53
- GÄRTNER R., GREIL W. (1986)
The mitogenic activity of IGF I, Insulin and
EGF on isolated porcine follicles is under
negative control of TSH and cAMP
Ann. d'Endocrin. 47, 116
- GÄRTNER R., GREIL W., STÜBNER D., PERMANETTER W.,
HORN K., PICKARDT C.R. (1985a)
Preparation of porcine thyroid follicles with
preserved polarity: Functional and morphological
properties in comparison to inside-out follicles
Mol. Cell. Endocrinol. 40, 9-16
- GÄRTNER R., GREIL W., DEMHARTER R., HORN K. (1985b)
Insulin and epidermal growth factor are growth
factors for isolated porcine thyroid follicles
Acta Endocrinol. 108, Suppl. 267, 86
- GÄRTNER R., GREIL W., DEMHARTER R., HORN K. (1985c)
Involvement of cyclic AMP, iodine and metabolites
of arachidonic acid in the regulation of cell pro-
liferation of isolated porcine thyroid follicles
Mol. Cell. Endo. 42, 145-155

- GREIL W., GÄRTNER R., DEMHARTER R. (1985)
Thyrotropin is not a growth factor for porcine thyroid cells in vitro
Acta Endocrinol. 108, Suppl. 267, 85
- GREIL W., GÄRTNER R., STÜBNER D., HORN K., PICKARDT C.R. (1984a)
Influence of cell polarity on functional properties of isolated porcine follicles
Ann.d.Endocrin. 45, 123
- GREIL W., GÄRTNER R., STÜBNER D., PERMANETTER W., HORN K. (1984b)
Preparation of isolated pig thyroid follicles with normal polarity and function
Acta Endocrinol. 105, Suppl. 264, 59
- HANSSON G., MALMSTEN C., RADMARK O. (1984)
The leukotrienes and other lipoxygenase products
In: Prostaglandins and related substances
Asciak P. und Granström (Ed.)
Elsevier Science Publishers, 127-158
- HAYASHI I., LARNER J., SATO G. (1978)
Hormonal growth control of cells in culture
In vitro 14, 23-30
- HERZOG V., MILLER F. (1981)
Structural and functional polarity of inside-out follicles prepared from pig thyroid gland
Europ.J.Cell Biol. 24, 74-84
- IGARASHI Y., KONDO Y. (1980)
Acute effect of thyrotropin on phosphatidylinositol degradation and transient accumulation of diacylglycerol in isolated thyroid follicles
Biochem.Biophys.Res.Comm. 97, 759-765
- JOSEPH S.K. (1984)
Inositol trisphosphate: an intracellular messenger produced by Ca^{2+} mobilizing hormones
Trends Biochem.Sci. 190, 420-421
- KARLSSON F.A., WESTERMARK K., WESTERMARK B. (1982)
Functional properties of porcine thyroid follicles in suspension
Mol.Cell.Endocrinol. 28, 99-112
- KRISHNARAJ R. (1978)
Cyclic AMP and cell proliferation:
A catalogue of positive correlations
Curr.Sci.Vol. 47, Nr. 11, 361-364

- LOHMANN S.M., WALTER U. (1984)
Regulation of the cellular and subcellular concentrations and distribution of cyclic-nucleotide dependent protein kinases
Adv.Cycl.Nucl.Prot.Phosphoryl.Res. 18, 63-117
- MANY M.C., DENEJ J.F., HAUMOND S. (1984)
Precocity of the endothelial proliferation during a course of rapid goitrogenesis
Acta Endocrinol. 105, 487-491
- MARX J.L. (1984)
A new view of receptor action
Science Vol. 224, 271-274
- NISHIZUKA Y. (1984)
Turnover of inositolphospholipids and signal transduction
Science Vol. 225, 271-274
- NITSCH L., WOLLMAN S.H. (1980)
Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture
Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 77, 2743-2747
- RAPOPORT B., FILETTI S., SETO P. (1984)
On the mechanism of "escape" from desensitization of the cyclic AMP response to TSH in cultured human thyroid cells
Mol.Cell.Endocrinol. 36, 181-186
- REID L., MORROW B., JUBINSKY P., SCHWARTZ E., GATMAITAN Z. (1981)
Regulation of growth and differentiation of epithelial cells by hormones, growth factors, and substrates of extracellular matrix
Ann.N.Y.Acad.Sci. 372, 355-370
- ROGER P.P., DUMONT J.E. (1982a)
Epidermal growth factor controls the proliferation and the expression of differentiation in canine thyroid cells in primary culture
FEBS LETTERS 144, 209-212
- ROGER P.P., DUMONT J.E., BOYNEAMS J.M. (1984)
Lack of prostaglandin involvement in the mitogenic effect of TSH on canine thyroid cells in primary culture
FEBS LETTERS 166, 136-140

- ROGER P.P.,HOTIMSKY A.,MOREAU C.,
DUMONT J.E. (1982b)
Stimulation by thyrotropin, cholera toxin and
dibutyrylcyclicAMP of the multiplication of
differentiated thyroid cells in vitro
Mol.Cell.Endocrinol. 26, 165-176
- ROGER P.P.,SERVAIS P.,DUMONT J.E. (1983)
Stimulation by thyrotropin and cyclic AMP of
the proliferation of quiescent canine thyroid
cells cultured in a defined medium containing
insulin
FEBS LETTERS 157, 323-329
- ROJKIND M.,GATMAITAN Z.,MACKENSEN S.,
GIAMBRONE M.-A.,PONCE P.,REID L.M. (1980)
Connective tissue biomatrix:
Its isolation and utilization for long-term
cultures of normal rat hepatocytes
J.Cell Biol. 87, 255-263
- DERUBERTIS F.R.,CRAVEN P.A.,SAITO R. (1984)
Bile salt stimulation of colonic epithelial
proliferation:
Evidence for involvement of lipooxygenase products
J.Clin.Invest. 74, 1614-1624
- RUBIN R.A.,EARP H.S. (1983a)
Solubilization of EGF-receptor with Triton X-100
alters stimulation of tyrosine residue
phosphorylation by EGF and dimethyl sulfoxide
J.Biol.Chem. 258, 5177-5182
- RUBIN R.A.,EARP H.S. (1983b)
Dimethyl sulfoxide stimulates tyrosine residue
phosphorylation of rat liver epidermal growth
factor receptor
Science Vol. 219, 60-63
- SAMUELSSON B. (1982)
Prostaglandins, thromboxans and leukotrienes:
Biochemical pathways
In: Prostaglandins and cancer:
First international conference
Alan R.Liss (Ed.)
Inc.N.Y., 1-19

- VANSANDE J., COCHAUX P., MOCKEL J.,
DUMONT J.E. (1983)
Stimulation by forskolin of the thyroid adenylate
cyclase, cyclic AMP accumulation and iodine
metabolism
Mol.Cell.Endocrinol. 29, 109-119
- SCRIBA P.C., BECKER S., BÜRGI H., ESCOBAR DEL R.F.,
GEMBICKI M., KOUNTRAS D.A., LAMBERG B.A., LANGER P.,
LAZARUS J.H., QUERIDO A., THILLY C., VIGNERI R. (1985)
Goitre and iodine deficiency in Europe
Report of the Subcommittee for the Study of
Endemic Goitre and Iodine Deficiency on the
European Thyroid Association
Lancet I: 1289-1293
- SEAMON K.B., DALY J.W. (1983)
Forskolin, cyclic AMP and cellular physiology
Trends Pharmacol.Sci. 4, 120-123
- SHERWIN J.R., TONG W. (1979)
Thyroidal autoregulation:
Iodine-induced suppression of thyrotropin-
stimulated cyclic AMP-production and iodinating
activity in thyroid cells
Biochim.Biophys.Acta 404, 30-39
- SMEDS S., WOLLMAN S.H. (1983)
³H-Thymidin labeling of endothelial cells in
thyroid arteries, veins, and lymphatics during
thyroid stimulation
Lab.Invest. Vol.48, 3, 285-291
- STUDER H. (1982)
Die euthyreote Struma
In: Klinische Pathophysiologie
W.Siegenthaler (Ed.)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart/N.Y.
Vol.5, 340 ff
- TONG W. (1974)
The isolation and culture of thyroid cells
In: Biomembranes, Part B
S.Fleischer u. L.Packer (Eds.)
Meth.Enzymol. Vol.32, 745-758

VALENTE W.A., VITTI P., KOHN L.D., BRANDI M.L.,
 ROTELLA C.M., TOCCAFONDI R., TRAMONTANO D.,
 ALOJ S.M., AMBESI-IMPIOMBATO F.S. (1983a)
 The relationship of growth and adenylate cyclase
 activity in cultured thyroid cells:
 Separate bioeffects of thyrotropin
 Endocrinol. 112, 71-79

VALENTE W.A., VITTI P., ROTELLA C.M.,
 VAUGHAN M.M., ALOJ S.M., GROLLMAN E.F.,
 AMBESI-IMPIOMBATO F.S., KOHN L.D. (1983b)
 Antibodies that promote thyroid growth:
 A distinct population of thyroid-stimulating
 autoantibodies
 NewEngl.J.Med.Vol. 309, Nr.17, 1028-1033

WESTERMARK B., KARLSSON F.A., WALINDER O. (1979)
 Thyrotropin is not a growth factor for
 human thyroid cells in culture
 Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 76, 2022-2026

WESTERMARK K., WESTERMARK B.,
 KARLSSON F.A., ERICSON L.E. (1986)
 Localisation of epidermal-growth-factor receptors
 on porcine thyroid follicle cells and receptor
 regulation by thyrotropin
 Endocrinol. 118, 1040-1046

WOLLMAN S.H. (1980)
 Structure of the thyroid gland
 In: The thyroid gland
 M.DeVisscher (Ed.)
 Raven Press, N.Y., 1-19

LEBENS LAUF

NAME	Demharter, Renate Maria Luzia
GEBOREN	25. Juni 1960
GEBURTSORT	Schwabmünchen
ELTERN	Alfred Demharter, Werkmeister Lydia Demharter, geb. Neumair, Hausfrau
SCHULEN	
1966-1971	Grund- und Hauptschule Gersthofen
1971-1980	Gymnasium Gersthofen (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig) Abschluß der reformierten Oberstufe mit der allgemeinen Hochschulreife (Hauptfächer: Biologie, Latein)
STUDIUM	
Nov. 1980	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Aug. 1982	Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1983	1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov. 1983	Beginn der Promotionsarbeit unter Betreu- ung von Herrn Prof.Dr.med K.Horn, Herrn Dr.med R.Gärtner und Herrn Dr.med W.Greil in der Endokrinologischen Abt. (Frau Prof.Dr.med C.R.Pickardt) an der Med.Klinik Innenstadt der LMU-München
Sept. 1985	2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 1985	Beginn des Praktischen Jahres am ZK Augsburg (Wahlfach : Pädiatrie)
Okt./Nov.1986	3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

